



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUILLERMO ANDRÉS CERQUERA CÁRDENAS

**CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES NA INTERAÇÃO
DE CÉLULAS COM VENENO DE *Loxosceles intermedia***

CURITIBA
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUILLERMO ANDRÉS CERQUERA CÁRDENAS

**CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES NA INTERAÇÃO
DE CÉLULAS COM VENENO DE *Loxosceles intermedia***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de Concentração em Patologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Larissa Magalhães Alvarenga
Co-Orientador: Marcel Ivan Ramirez Araya

**CURITIBA
2018**

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Cárdenas, Guillermo Andrés Cerquera

Caracterização de vesículas extracelulares na interação de células com veneno de *Loxosceles intermedia*. / Guillermo Andrés Cerquera Cárdenas. – Curitiba, 2018.

69 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Larissa Magalhães Alvarenga

Co-orientador: Marcel Ivan Ramirez Araya

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Aranha - Veneno. 2. Resposta imune. I. Título II. Alvarenga, Larissa Magalhães. III. Araya, Marcel Ivan Ramirez. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 591.69



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“Caracterização de vesículas extracelulares na interação
de células com veneno de *Loxosceles intermedia*”**

por

Guillermo Andrés Cerquera Cárdenas

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau
de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia
e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:


Profa. Dra. Larissa Magalhães Alvarenga – Presidente


Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer


Prof. Dr. Glaucio Valdameri

Curitiba, 13 de julho de 2018.

*Dedico este trabalho a Minha Esposa, pais,
irmã e meus avós. Por seu amor, conselhos,
paciência, apoio incondicional. Amo vocês
mais do que tudo!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Primeiramente a Deus pela saúde, fortaleza, proteção e Sabedoria neste tempo de trabalho. Dou graças à Deus pela presença constante em minha vida e a força quando faltava por continuar.

Agradeço à minha Esposa, Angie D Becerra, pela ideia e risco de vir até Brasil, além de seu apoio, amor e dedicação, obrigado por tudo. Agradeço à minha família, a qual eu amo imensamente! Aos meus pais, avós e a minha irmã, pela força, amor e seu apoio apesar da distância

Devo agradecer à Universidade Federal do Paraná e ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela oportunidade de realizar o meu mestrado. Aos professores e funcionários do programa obrigada pelo ensinamento, disponibilidade e apoio.

Aos orientadores Prof^a. Dra. Larissa Magalhães Alvarenga, e Prof^o. Dr. Marcel Ramirez pela oportunidade de aprender a pesquisar. Obrigado pela paciência, orientação, ensinamentos e por acreditar na minha capacidade.

À CAPES e ao CNPQ pela bolsa de mestrado e suporte financeiro para as pesquisas.

Às prof^a Dras Juliana Ferreira de Moura, pela ajuda e apoio e recebimento no lab. Também a prof^a Dra Alexandra Becker por sua ajuda e seu conhecimento para superar os problemas do dia a dia.

Aos meus colegas e amigos de laboratório LIMQ: Carla Yoko Tanikawa de Andrade, Isabel Biasi Yamanaka, Rafaela Lenzi Fogaça, Michele Weber, Sabrina Karin Silva, Fábio Gaio Chimentão, Juliana Santana, Camila Mondini, Isabela Jiacomini, pelo apoio e auxílio no desenvolvimento do trabalho, além da sua amizade nos momentos mais difíceis.

Ao laboratório do Prof. Dr. Sílvio Zanata (laboratório de Neurobiologia – Patologia Básica – UFPR), por gentilmente emprestar a ultracentrífuga para a execução deste trabalho.

Dra. Maria Galli de Amorim do laboratório de Genômica Médica – Centro

Internacional de Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center (São Paulo) pela atenção e disponibilidade para analisar amostras pelo Nanosight.

Agradeço a meus colegas de outros laboratórios: Jose, bruno, Lisandro, e Isadora pela ajuda e apoio no momento preciso

RESUMO

O araneismo (envenenamento causado por aranhas) é um problema de saúde pública no Brasil. Na região sul e sudeste as principais notificações do loxocelismo são ocasionadas pelas espécies predominantes *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, e, de acordo com os dados da Secretaria de Saúde de Paraná, em 2017 foram notificados mais de 4000 casos de loxocelismo. O envenenamento em humanos pode ser caracterizado por duas variantes clínicas: o loxoscelismo cutâneo e o loxoscelismo sistêmico. Inúmeros protocolos para o tratamento do envenenamento loxoscélico já foram propostos e testados, sendo a soroterapia o único tratamento específico apontado com maior potencial de neutralização na ação do veneno. Dentro do contexto do envenenamento não tem sido descrito o papel de vesículas extracelulares como produto ou indutor de efeitos citotóxicos. Neste trabalho avaliamos a liberação de vesículas extracelulares (Exosomas ou Microvesículas) decorrentes do contato entre veneno/toxinas com as células. Nas três diferentes linhagens celulares testadas foi possível detectar a produção de vesículas extracelulares, e as mesmas foram induzidas de maneira dose dependente em relação às concentrações de veneno empregadas. Foram demonstrados ainda efeitos biológicos dessas vesículas e a inibição da produção das mesmas pela adição de anticorpos monoclonais específicos para toxinas loxoscelicas. Os achados aqui abrem uma nova perspectiva para o entendimento dos possíveis mecanismos de interações celulares, propagadores dos efeitos citotóxicos dos venenos Loxoscelicos.

Palavras-chave: Loxosceles, loxoscelismo cutâneo, imunogenicidade

ABSTRACT

The spider bites (Envenomation) is a problem in public health in Brazil, in the south and southeast region has a main notification of the loxoscelism caused by the predominant species *L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta*, according to figures from the secretary of health of Paraná were notified in 2017 approximately 4000 cases by loxoscelism. Envenomation in humans can be characterized by two clinical variants: cutaneous loxoscelism and systemic loxoscelism. Numerous protocols for the treatment of loxoscelism have been proposed and tested. Serotherapy being the only specific treatment indicated with greater potential for neutralization in the action of venom. Within the context of poisoning the role of extracellular vesicles as a product or as an inducer has not been described. In this work, we evaluated the release of extracellular vesicles (Exosomes or Microvesicles) arising from the contact between poison and toxins with the cells. In the three different cell lines tested it was possible to detect the production of extracellular vesicles, and they were induced in a dose-dependent manner in relation to the concentrations of venom employed. Biological effects of these vesicles and the inhibition of their products have also been demonstrated by the addition of monoclonal antibodies specific for Loxoscelicas toxins. The findings here open up a new perspective for the understanding of the possible mechanisms of cellular interactions, which propagate the cytotoxic effects of Loxoscelism venoms.

Keywords: Loxosceles, skinloxoscelism, extracellular vesicles

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: VESICULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DA INTERACAO DE DIFERENTES LINHAGENS CELULAS COM VENENO DE LOXOCESLES INTERMEDIA.	36
FIGURA 2 DIFERENTE LIBERAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE ERITRÓCITOS SOMETIDOS A VENENO LI.....	37
FIGURA 3: CARACTERIZAÇÃO POR NANO SIGHT	38
FIGURA 4: CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DE COMPONENTES DE VENENO ATRAVÉS DE ELISA SANDWICHE.....	40
FIGURA 5: WESTERN BLOTTING E ANALISE ELETROFORETICO DE VES DE HEMACIAS.....	42
FIGURA 6: ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA IN VITRO.....	43
FIGURA 7: INDUÇÃO DE CITOCINAS DURANTE A INTERAÇÃO DE MACRÓFAGOS COM VEs E VENENO DE Li	45
FIGURA 8: ENSAIO HEMOLÍTICO NA PRESENÇA DE VEs.....	46
FIGURA 9: ESGOTAMENTO DE LIPIDS RAFTS ENVOLVIDOS NAS VEs.....	48
FIGURA 10: UP-TAKE MICROVESÍCULAS ERITRÓCITOS CÉLULAS HEK 293.	49
FIGURA 11: INTERNALIZAÇÃO DE IODETO DE PROPÍDEO EM CÉLULAS HEK 293 TRATADAS COM VENENO E VES	51
FIGURA 12: INIBIÇÃO DO EFEITO DE Li E VES-Li NA PRESENÇA DE ANTICORPO	53
FIGURA 13: LIBERAÇÃO DE VES-Li NA PRESENÇA DE ANTICORPOS	55
FIGURA 14: LIBERAÇÃO DE VES IN VIVO:	56

LISTA DE TABELA

TABELA 1 - SOLUÇÕES E COMPOSIÇÃO 23

TABELA 2 - PORCETAGEM DE VENENO NAS VES..... **¡Error! Marcador no definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaCl₂- Cloreto de cálcio

CO₂ - Dióxido de carbono

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

EGTA - Ácido etileno glicol tetra-acético

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

HCl- Ácido clorídrico

IFN- γ - Interferon-gama

IL-6 - Interleucina-6

KCl- Cloreto de potássio

Li -Loxosceles Intermedia

KH₂PO₄ - Fosfato monobásico de potássio

MCP-1/CCL2 - Proteína quimioattractante de monócitos-1 (do inglês, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*)

NaHCO₃ - Bicarbonato de sódio

Na₂HPO₄ - Fosfato de sódio dibásico

NaOH - Hidróxido de sódio

PBS - Tampão fosfato-salino (do inglês, *PhosphateBuffered Saline*)

PMA - 12-miristato 13-acetato de forbol

RPMI - do inglês, *Roswell Park Memorial InstituteMedium*

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TGF- β - Fator de transformação do crescimento- β (do inglês, *Transforming GrowthFactor- β*)

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α (do inglês, *TumourNecrosisFactor- α*)

VEs - Vesículas Extracelulares

VEs-ELi - Vesículas Extracelulares interação Eritrócito Veneno *Li*

VEs-ELr - *Vesículas Extracelulares interação Eritrócito Lactato Ringer*

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO LITERÁRIA	16
2.1 Epidemiologia e o Loxoscelismo.	16
2.2 Veneno e efeitos dos componentes biologicamente ativos.....	17
2.3 Tratamento.....	18
3. JUSTIFICATIVA.....	20
4. OBJETIVOS	22
4.1 OBJETIVO GERAL	22
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	22
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
5.1 SOLUÇÕES	23
5.2 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	24
5.3 VENENOS E SORO ANTILOXOSCÉLICO	24
5.4 ANTICORPOS POLICLONAIS E MONOCLONAL LIMAB7	25
5.5 ELISA SANDUÍCHE.....	25
5.6 ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS -SDS-PAGE E COLORAÇÃO NITRATO DE PRATA	26
5.7 WESTERN BLOTTING	26
5.8 OBTENÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	27
5.9 DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD	28
5.10 ANÁLISE DE VES POR NANOSIGTH.....	28
5.11 ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA	29
5.12 ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	29
5.12 HEMÓLISE	29
5.13 REMOÇÃO DE COLESTEROL DE MEMBRANAS PLASMÁTICAS.....	30
5.14 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS: IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA ...	30
5.15 DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS THP-1 EM MACRÓFAGOS.....	31
5.16 ENSAIO DE <i>UPTAKE</i>	31
5.17 ENSAIOS DE FLUORESCÊNCIA E IMUNOFLUORESCÊNCIA	32

5.18 ESTUDO IN VIVO	33
5.18.1 Avaliação da produção de vesículas extracelulares em camundongos desafiados com veneno de Li	33
6. RESULTADOS	35
6.1. EFEITO DO VENENO DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> SOBRE DIFERENTES LINHAGENS CELULARES.	35
6.2 CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	37
6.2.1 Análise de VEs utilizando <i>Nanosight</i>	37
6.2.2. Caracterização das microvesículas através de imuno ensaios.....	39
6.3 EFEITO BIOLÓGICO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	43
6.3.1 Atividade esfingomielinásica das microvesículas de eritrócitos derivadas da exposição ao veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> com eritrócitos	43
6.3.2 Indução de resposta imune: liberação de citocinas durante o contato de VEs e THP1	44
6.3.3 Ensaio de Hemólise produzido pelas vesículas extracelulares.....	46
6.3.4 Colesterol envolvido na liberação de VEs.....	47
6.4 EFEITO DAS VES CONTENDO COMPONENTES DO VENENO SOBRE A MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS HEK	48
6.5 EFEITO DAS MICROVESÍCULAS NA ALTERAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICAS.....	50
5.6 EFEITO NEUTRALIZANTE DO ANTICORPO MONOCLONAL LI MAB7 NA INIBIÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE MEMBRANA EM CÉLULAS HEK293 TRATADAS COM VENENO E VES.	52
5.7 EFEITO NEUTRALIZANTE DO MAB7 NA LIBERAÇÃO DE VES E NA HEMÓLISE DO ERITRÓCITO.	54
5.8 AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA PRODUÇÃO DE VES EM CAMUNDONGOS DESAFIADOS COM VENENO.....	55
7. DISCUSSÃO	57
REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, as aranhas do gênero *Loxosceles*, denominadas popularmente por aranhas marrons, foram sinalizadas como agentes causadores de acidentes, em especial nas regiões Sul e Sudeste, onde predominam as espécies *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (PAULI *et al.*, 2009). Na última década, estudos realizados motivados pela elevada infestação e pelo crescente número de casos, sugerem que a distribuição se tornou heterogênea e disseminada nas áreas urbanas (DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004; TAMBOURGI *et al.*, 2010).

O envenenamento em humanos pode ser caracterizado por duas variantes clínicas: o loxoscelismo cutâneo e o loxoscelismo sistêmico. Os sintomas locais comuns são a dor, edema e uma necrose na área da inoculação do veneno (CHAVES *et al.*, 2009; DIAS LOPES *et al.*, 2014). Por outro lado, pode apresentar sintomas sistêmicos como: hemólise intravascular, insuficiência renal e uma coagulação intravascular disseminada (TAMBORGUI *et al.*, 2010; BARRETO *et al.*, 1985). Neste sentido, é importante conhecer os diferentes componentes do veneno que podem estar envolvidos com esses sintomas. Já tem sido descrito que o veneno possui diferentes proteínas: hialuronidase, serino proteases, Esfingomielinase D, e astacinas (FUTRELL *et al.*, 1992; TAMBOURGI *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000; BÁRBARO *et al.*, 2005; FEITOSA 1998; SWANSON e VETTER 2006; GRESMKI *et al.*, 2014).

Recentemente estudos *in vitro* com utilização de diferentes linhagens celulares tem permitido um melhor entendimento do mecanismo de ação relacionado aos componentes do veneno (PATEL *et al.*, 1994; PALUDO *et al.*, 2006; DRAGULEV *et al.*, 2007; TAMBOURGI *et al.*, 2000, 2007; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; DIAS-LOPES *et al.*, 2010; WILLE *et al.*, 2013; HORTA *et al.*, 2013). Apesar dos avanços nos referidos artigos, alguns efeitos não estão completamente esclarecidos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos de liberação de vesículas extracelulares resultantes da interação celular com o veneno da aranha *L. intermedia* e a inibição desses efeitos utilizando anticorpos anti-toxinas em modelos *in vitro*.

2. REVISÃO LITERÁRIA

2.1 Epidemiologia e o Loxoscelismo.

Estima-se que, no mundo, ao menos 2,5 milhões de pessoas sejam envenenadas por serpentes todos os anos; 1,2 milhões por escorpiões; e só no Brasil, aproximadamente 20.000 por aranhas (LOVRECEK e TOMIC, 2011; WARREL, 2012). Loxoscelismo, aracnidismo necrótico ou gangrenoso são alguns dos termos utilizados para descrever lesões cutâneas necróticas degenerativas e manifestações clínicas caracterizadas por falha renal e distúrbios hematológicos provocados por acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles*, que atualmente é a espécie mais notificada no araneísmo mais importante em alguns países, e a terceira causa de envenenamento por animais peçonhentos no Brasil (PAULI *et al.*, 2009).

Embora esses aracnídeos apresentem ampla distribuição mundial, na última década, muitos estudos vêm sendo realizados com o veneno dessas aranhas motivados pela elevada infestação intradomiciliar e pelo crescente número de casos ocorridos na região sul e sudeste do Brasil, e em especial no estado do Paraná de acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN 2016).

Dentre as espécies de *Loxosceles* comumente citadas pela capacidade de gerar o efeito dermonecrotico ou por sua grande distribuição e contato com ambientes humanos, são bem conhecidas: *L. laeta*, *L. gaucho*, *L. reclusa*, *L. deserta*, *L. rufescens* e *L. intermedia*. Cada espécie tem características e distribuições próprias, no entanto, é importante ressaltar que dentre as espécies prevalentes no Brasil e no estado do Paraná, *L. intermedia* (MELLO-LEITÃO, 1934) é a mais abundante (MARQUES e FISHER, 2000; MÁLAQUE *et al.*, 2002).

As manifestações do envenenamento por aranhas marrom são classificadas em loxoscelismo cutâneo ou loxoscelismo visceral, este último também chamado sistêmico ou hemolítico. As manifestações cutâneas, segundo (PAULI *et al.*, 2006), representam 67% a 100% dos casos, e resultam em dor moderada e eritema, podendo evoluir a lesões necróticas de crescimento lento e gradual no local da

picada. Devido a efeitos deletérios ao endotélio vascular, o veneno pode indiretamente provocar agregação plaquetária, coagulação sanguínea intravascular, vasodilatação, aumento da permeabilidade sanguínea, enfraquecimento dos vasos e até hemorragia (VETTER e SWANSON, 2006).

Nos dias que sucedem a picada pode ocorrer uma grande infiltração de neutrófilos na derme e lesões dermonecroticas que são evidenciadas em até 72h. As lesões são caracterizadas pela formação de bolhas e pústulas, ou evoluem para uma escara de lenta cicatrização. No local da picada também se evidencia uma região de coloração vermelho-arroxeadada, onde o paciente costuma sentir dor e sensibilidade (ISBISTER e FAN, 2011; CATALÁN *et al.*, 2010). No loxoscelismo cutâneo também se observa inflamação, isquemia e espalhamento gravitacional da lesão na pele, sendo mais grave em pessoas obesas, uma vez que enzimas do veneno destroem com maior rapidez tecidos adiposos pouco vascularizados (VETTER, 2008).

Manifestações sistêmicas são raras, representam risco de vida especialmente tratando-se de crianças, e correspondem de 0 a 30% dos casos (PAULI *et al.*, 2006). Têm como principal característica a anemia hemolítica intravascular aguda e a partir de sete dias após o envenenamento já é possível observar a diminuição da concentração de hemoglobina do paciente (ISBISTER e FAN, 2011).

2.2 Veneno e efeitos dos componentes biologicamente ativos

A composição do veneno de *Loxosceles* é uma complexa mistura de substâncias biologicamente ativas, podendo conter: sais inorgânicos, pequenos peptídeos, neurotoxinas e proteínas de alta ou baixa massa molecular. Dentre as proteínas envolvidas com a toxicidade do veneno, as proteínas da família Loxtox, em especial a enzima esfingomielinase D (SMD), de aproximadamente 32 kDa, são consideradas componentes chave para o desencadeamento da dermonecrose (FELICORI *et al.*, 2009; APPEL *et al.*, 2008).

Experimentos com HUVEC (células endoteliais de veia umbilical), identificadas como agonistas do veneno, apontam que o veneno estimula expressão de E-selectina de células endoteliais e secreção de IL-8 por macrófagos favorecendo um perfil proinflamatório, além de gerar uma comunicação com neutrófilos para uma propagação do efeito do veneno (PATEL *et al.*, 1994. GREMSKI *et al.*, 2014). A partir de culturas de fibroblastos expostos a Sphingomyelinase D (SMD) recombinante observou-se desregulação de citocinas que são importantes ativadores inflamatórios. Os autores postulam que junto com o endotélio, os fibroblastos na derme também medeiam a desregulação e ativação dos leucócitos envolvidos na dermonecrose (DRAGULEV *et al.*, 2007, GREMSKI *et al.*, 2014). A ligação direta do veneno na superfície de células endoteliais também foi reportada. Assim como, a internalização das toxinas envolvendo vesículas endocíticas que levam ao lisossomo e culmina em morte por apoptose (PALUDO *et al.*, 2006, NOWATZKI *et al.*, 2010, GREMSKI *et al.*, 2014).

Referente à ação do veneno sobre os eritrócitos, acredita-se que a hemólise está associada com um mecanismo distinto, seja por efeito direto (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009) ou dependente de complemento (TAMBOURGI *et al.*, 1998), no entanto demonstrou que a atividade hemolítica pode ser transferida para uma população de células não expostas ao veneno (TAMBOURGI *et al.*, 2000). Explicando dessa forma, a hemólise sistêmica observada após o envenenamento.

2.3 Tratamento

Até hoje, o tratamento mais eficaz para o loxoscelismo ainda é discutível, principalmente quando é levada em consideração a dificuldade de identificação da espécie responsável pelo acidente. Dentre os tratamentos já recomendados estão:

uso de compressas, vasodilatadores, anti-histamínicos, realização de excisão cirúrgica, transfusões sanguíneas, diálises, assim como uso de antivenenos. O uso de antivenenos é o tratamento mais usado no Brasil e considerado o de melhor resultado desde que administrado poucas horas após a picada (PAULI *et al.*, 2006). Atualmente, no estado do Paraná, o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) é o responsável pela fabricação do soro anti-loxoscélico (SALox), que contém anticorpos obtidos pela imunização de equinos com quantidades equivalentes dos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (Braz *et al.*, 1999). Os antivenenos são utilizados em tratamento de lesões moderadas a graves. Uma desvantagem na produção dos antivenenos refere-se à pouca especificidade dos anticorpos do soro em relação às regiões mais antigênicas do veneno. Autores como (CHOW e CASADEVALL, 2012, LOVRECEK e TOMIC, 2011) ressaltam que o uso de anticorpos monoclonais também pode ser uma ferramenta na produção de neutralizadores de venenos, e que talvez no futuro, possam substituir a produção de soros heterólogos.

Como uma maneira de evitar as reações adversas dos soros heterólogos: rubor cutâneo, urticária, náuseas, vômito e crise asmática, assim como reações mais graves (arritmias cardíacas, hipotensão arterial, choque anafilático e quadro obstrutivo das vias respiratórias) acredita-se que a utilização de anticorpos recombinantes seja uma solução viável para esses problemas.

Diversos anticorpos recombinantes humanos, murinos ou quiméricos já foram aprovados como ferramentas terapêuticas para humanos pelo órgão *Food and Drug Administration* nos Estados Unidos. Podem ser usados como marcadores moleculares ou no tratamento de doenças crônicas e cânceres (ESPINO-SOLIS *et al.*, 2009). Atualmente, estudos como o de OLIVEIRA *et al.*, 2009, com a neutralização de enzimas fosfolipases AMARO *et al.*, 2011, com a neutralização da enzima Ts1 de *Tityus serrulatus*, mostram que anticorpos recombinantes também são capazes de neutralizar efeitos tóxicos tanto de venenos ofídicos como aracnídeos.

3. JUSTIFICATIVA

Até agora nenhum estudo foi publicado no qual fosse avaliada a produção de vesículas extracelulares em células tratadas com os venenos loxoscelicos. Efeito,

composição, dinâmica de produção de tais vesículas poderiam abrir novas possibilidades de interpretação sobre a ação do veneno localmente, sistemicamente e especialmente ao longo do tempo. O estudo envolvendo vesículas extracelulares tem ganhado atenção de parasitologistas, cancerologistas e infectologistas, tendo em vista o potencial de ação das mesmas nos diferentes mecanismos celulares e consequente envolvimento destas nas diferentes patologias (Cocucci et al..2009, Evans-Osses et al.2015). Pretendemos entender melhor o mecanismo toxico do veneno, estudando novos formatos interação celulares ainda não explorados no contexto do loxoscelismo, e usar anticorpos específicos para componentes do veneno para neutralizar tais manifestações.

Nos últimos anos tem sido mostrado que em diferentes modelos biológicos e doenças existe uma liberação de vesículas extracelulares (exosomos e microvesículas) que carregam biomoléculas (proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, hormônios, citocinas, etc) e podem estabelecer uma comunicação celular entre diferentes células e alterar o efeito fenotípico delas.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação da capacidade do veneno de *Loxosceles intermedia* induzir a produção de vesículas extracelulares, assim como validar capacidade neutralizante de anticorpos específicos para componentes do veneno, inibirem tais efeitos.

4.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar diferentes linhagens celulares quanto a capacidade de produzir Vesículas extracelulares na presença do veneno de *L. intermedia*;
- ✓ Avaliar a produção, composição e efeito fenotípico de vesículas extracelulares de células tratadas com veneno. >
- ✓ Verificar e comparar potencial protetor/neutralizante de anticorpos monoclonais murinos, específicos para toxinas Loxocelicas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 SOLUÇÕES

TABELA 1 - SOLUÇÕES E COMPOSIÇÃO

Solução	Composição
(Tampão Fosfato) PBS 1 X	NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na ₂ HPO ₄ 10,0 mM; KH ₂ PO ₄ 1,8 mM; pH 7,4
Solução para coloração de géis de proteínas SDS-PAGE	(0,1 % azul de Comassie, 10 % ácido acético, 40% etanol)
Solução de descoloração	(40 % Etanol, 10 % ácido acético, 50 % água destilada)
Tampão de amostra para proteína 1X	Tris-HCl 50mM pH 6,8; glicerol 10% (v/v); SDS 2%; DTT 5 mM; azul de bromofenol 0,01%; 5% β-mercaptoetanol
Tampão de eletroforese para SDS PAGE	Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%, pH 8,3
Tampão HEPES	Hepes 10 mM; pH 7,4
Ponceau S	Ponceau S 0,1% (p/v) e ácido acético 5%
Solução de bloqueio para <i>Western blot</i>:	Tampão PBS 1X; Tween-20 0,05% (v/v); leite em pó desnatado 5% (p/v)

FONTE: O autor (2018)

5.2 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para a realização dos experimentos foram utilizadas diferentes linhagens celulares THP1 (linhagem celular monocítica de humano) HEK 293 (linhagem celular epitelial rim humano) Huvec (Linhagem celular endotelial humano) e VERO (Linhagem celular epitelial rim de macaco) as quais foram obtidas do banco de células do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. As linhagens foram mantidas em meio RPMI 1640 e DMEM com 2mM de L-glutamina (Sigma) suplementado com bicarbonato de sódio (14mM), 10 % de soro fetal bovino (GIBCO) inativado (30 min. a 56°C), acrescido 1 % de estreptomicina e penicilina (GIBCO). As células foram mantidas em incubadora CO₂ a 37°C, numa atmosfera úmida, sob 5% CO₂. As linhagens celulares THP1 e VERO foram mantidas com meio RMPI, HEK 293 e Huvec foram mantidas como DMEM. As trocas de meios foram realizadas cada dois dias até células, atingir em confluência. Para realizar as passagens celulares, as células foram inicialmente lavadas com meio sem soro, sendo posteriormente, dissociadas pela adição de 500 µl tripsina (enzima proteolítica) 0,02% (Sigma-Aldrich) por 5 minutos permitindo o desprendimento das células, posteriormente eram ressuspensas adicionado meio suplementado com 10% SFB, para inibir a ação da tripsina. Dependendo do objetivo do ensaio, as células foram distribuídas garrafas de cultivo, ou placas de 24 poços para ensaios. O estoque das células foi mantido pelo congelamento em meio de cultura com SFB, adicionado DMSO 10 % e armazenado em freezer -80 °C

5.3 VENENOS E SORO ANTILOXOSCÉLICO

Soro antiloxoscélico, assim como os venenos de *L. laeta*, *L. gaucho*, e *L. Intermedia* foram cedidos pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos Gentileza do Dr Joao Minozo.(CPPI – Piraquara, PR, Brasil).

5.4 ANTICORPOS POLICLONAIS E MONOCLONAL LIMAB7

Anticorpos policlonais de cavalo, específicos para o veneno de *Loxosceles intermedia*, foram obtidos do soro antiloxoscélico cedido pelo CPPI, a partir de cromatografia de afinidade usando veneno de *L. intermedia* imobilizado na coluna em Sepharose CNBr- e eluído com glicina 0,1M pH 2,8. A partir das imunoglobulinas purificadas foi preparado um conjugado, IgG- HRP, no qual os anticorpos específicos permaneciam covalentemente ligados à enzima peroxidase (anti Li-HRP), esses anticorpos foram preparados empregando-se o mesmo protocolo descrito em CHAVEZ-OLORTÉGUI et al., 1998.

Os anticorpos monoclonais murinos foram purificados a partir do sobrenadante de hibridoma secretor de LimAb7 (ALVARENGA et al., 2003) por cromatografia de afinidade usando proteína A-imobilizada em SepharoseCNBr- (Sigma®) nas mesmas condições descritas pela autora.

5.5 ELISA SANDUÍCHE

Placas de 96 poços foram revestidas com uma solução contendo anticorpo murinho LiMab7 10µg/ml de tampão de bicarbonato de sódio (pH 9,6) durante 16 horas a 4 °C e depois saturou-se com caseína 2% durante 1 hora a 37 °C. As placas foram então incubadas durante 1 hora com veneno de *L. intermedia* em uma diluição seriada de 1µg/ml até 0,001 µg/ml, ou com amostras de vesículas extracelulares eritrócitos (10, 15 ou 20 µg/poço) por 1h/37 °C, posteriormente por mais 1h/37 °C foram incubadas com anti Li-HRP. A solução substrato orto – fenilenodiamina (OPD) (100 µL/poço) foi adicionada e a reação foi interrompida com H₂SO₄ (1:20). A absorbância avaliada a 490 nm (Microplate Reader 550, BIORAD). Entre cada incubação, as placas foram lavadas quatro vezes com solução de lavagem. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

5.6 ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS -SDS-PAGE E COLORAÇÃO NITRATO DE PRATA

Proteínas do veneno de *L. Intermedia*, de células lisadas foram separadas por SDS-PAGE (12,5%) usando tampão de amostra com agente redutor (β -mercaptanol), e resolvidas a 100-110 mA. Os géis foram fixados em solução fixadora (etanol 40%; ácido acético 12% e formaldeído 0,02%) pôr no mínimo 1 h. Em seguida foram lavados duas vezes com etanol 30% por 10 min e uma vez com água por 20 min sob agitação. A sensibilização foi feita com glutaraldeído por 30 minutos foi lavado 3 vezes com água destilada por 20 min sob agitação. Subsequentemente, a coloração foi realizada com uma solução de nitrato de prata 0,1% em banho de gelo por 20 min. Após este tempo, os géis foram lavados cinco vezes com água e revelado em solução de revelação (carbonato de sódio 3% e formaldeído 0,05%) até o aparecimento das bandas. Após, foram lavados três vezes com água e a revelação foi interrompida com a adição de ácido acético 5% por 1 min. No final, o gel foi lavado três vezes com água por 10 min e armazenado com água a 4 °C por no máximo 3 dias. Durante as etapas de lavagem foi usada água destilada e todas as incubações foram feitas sob agitação.

5.7 WESTERN BLOTTING

Proteínas do veneno de *L. Intermedia*, de células lisadas foram separadas por SDS-PAGE (12,5%) usando tampão de amostra sem agente redutor, e resolvidas a 100 - 110 mA. O gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose ou PVDF 0,45 μ m. A transferência se faz inicialmente usando tampão de transferência pH 8,3 (0,192 M glicina, 0,025 M Tris, 20% de metanol absoluto (v/v) PM 32,04), que permanece no gelo por 2 horas sob corrente elétrica de 100 V. Após a transferência, a membrana foi corada por *Ponceau* (1 g de *ponceau*, 50 ml de ácido acético, q.s.p. 1000ml de água destilada). Os locais de ligação não específicos foram bloqueados durante 1 hora em PBS contendo 5% (w/v) de leite seco sem gordura e 0,3% (v/v) de Tween 20 (LAEMMLI, 1970; ALVARENGA et al., 2003).

Para detecção de proteínas de Veneno, as membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpos purificados Limab7) e/ou anticorpo policlonal em diferentes concentrações. A reatividade foi detectada por incubação com anti mouse-HRP (1:2000) (Sigma-Aldrich), ou antihorse-HRP (1:30.000) (Sigma-Aldrich). Os imunocomplexos foram corados com o substrato apropriado (diaminobenzidina (DAB) ou quimioluminescência (ECL)) (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA). As incubações foram realizadas durante 1 hora a 37 °C sob agitação e a membrana foi lavada cinco vezes com PBS, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20, entre as etapas descritas.

5.8 OBTENÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

As células HEK, VERO e Huvec cultivadas até atingir semiconfluência e foi realizada manutenção das células descrito item 4.2. Posteriormente Foram semeadas em placas de 24 poços numa confluência de 1×10^5 células:/ poço por 24 horas até as células se aderirem ao fundo dos poços. No dia seguinte foi retirado o meio com soro e acrescentado meio sem soro e veneno de *Loxosceles intermedia* nas concentrações de 20, 10, 5 e 2,5 µg/ml ou de 2mM de CaCl_2 (Sigma-Aldrich) como controle de vesiculação. A incubação procedeu durante 1, 3 ou 24 horas a 37 °C. Foram recoletados os sobrenadantes celulares e as Vesículas Extracelulares foram separadas por meio de centrifugação diferencial. Após centrifugação a 600xg durante 5 min, o sobrenadante foi novamente centrifugado a 4000xg durante 30 min em temperatura 4°C (este procedimento foi repetido por mais duas vezes). O *pellet* contendo restos celulares foi descartado e o sobrenadante contendo as VEs foi ultracentrifugado a 100.000xg durante 90 min em temperatura de 4°C (ultra centrífuga BeckmanCoulter, Inc.). Após o descarte do sobrenadante, as VEs foram ressuspensas em HEPES previamente filtrado com membrana de 0,22µm (Millipore) guardadas a 4°C no período máximo de 7 dias.

No caso das células THP1, células não aderentes, foram centrifugadas uma vez e posteriormente suspendidas com RPMI sem soro a 37 °C. Nos experimentos foram utilizados inicialmente concentrações de 1×10^4 o 1×10^5 células, as quais

foram incubadas em tubos tipo eppendorfs de 1,5 ml contendo meio RPMI, veneno *Ixosceles intermedia* (20,10, 5 e 2,5 µg/ml) ou agente indutor CaCl_2 2mM, a incubação com o veneno foi por 1, 3 e 24 horas a 37°C. Foram feitas as centrifugações diferenciais anteriormente descritas, e as VEs foram suspendidas em HEPES e guardadas a 4°C no máximo por 7 dias.

Para os eritrócitos, os mesmos foram coletados a partir de sangue e previamente lavados como foi descrito no método de hemólise (ainda não foi descrito hemólise), após da recolecção foram incubados com lactato de ringer a 37°C ou com concentrações de veneno 2.5, 5, 10 e 20 5 µg/ml por 3, 12 e 24 horas. No controle de vesiculação utilizamos só lactato de ringer posto que os eritrócitos têm que estar sob agitação. Foram feitas as centrifugações diferenciais como anteriormente descritas. As VEs foram suspendidas em HEPES e armazenadas a 4°C no máximo de 7 dias

5.9 DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD

A concentração de proteínas presentes nas vesículas extracelulares foi determinada utilizando-se o método de Bradford, (Bradford, 1976). A absorbância foi obtida em 570 nm em leitor de microplacas (microplatereader 550, BIORAD).

5.10 ANÁLISE DE VES POR NANOSIGTH

O tamanho das VEs foi determinado por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). A técnica NTA combina microscopia de espalhamento de luz com uma câmera de carga acoplada (CCD), que permite a visualização e a gravação de um filme das nanopartículas (neste caso, as MVs) em suspensão. As partículas são visualizadas pelo espalhamento da luz refletida por elas quando iluminadas por um laser e vídeos da luz espalhada pelas partículas são captados com a câmera CCD. O software NTA é capaz de identificar e rastrear cada nanopartícula que se desloca sob o movimento browniano e relacionar o movimento

ao tamanho da partícula, através da equação de Stokes-Einstein. Neste trabalho, as amostras de VEs foram diluídas com tampão PBS em frações de 1000 µl. Cada fração de vesículas diluída foi analisada em triplicata a temperatura ambiente (25°C), por 60s a 10 quadros por segundo, utilizando o equipamento Nanosight NS300 (NanoSight, Reino Unido). O programa utilizado para a captura e análise dos dados foi NTA, versão 2.3 build 0017.

5.11 ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA

A capacidade de indução da atividade esfingomielinásica foi observada usando o kit de ensaio de esfingomielinase Amplex® Red(segundo protocolo descrito por Lopes et al, 2013) Veneno de *Loxosceles intermedia* (2,5 µg/ml) e vesículas extracelulares induzidas pelo contato de eritrócitos com veneno *Loxosceles intermedia* (166, 33 e 17 µg/ml), e Vesículas Extracelulares induzidas com lactato do ringer na mesma concentração das VEs ELi foram adicionados à mistura de reagentes Amplex (100 µl), essas ultimas como controle negativo. Após a adição do reagente, a mistura permaneceu por mais 30 minutos a 37 °C ao abrigo da luz antes de ser medida a fluorescência de excitação/emissão a 550/590 nm em um fluorímetro (TECAN-RCHISTO INFINITE M200). A solução tampão do kit foi utilizada como controle negativo. O teste foi realizado nas mesmas condições sugeridas pelo fabricante.

5.12 ESTUDOS *IN VITRO*

5.12 HEMÓLISE

Para determinar atividade hemolítica, foi coletado sangue humano em tubos contendo tampão citrato de sódio (BD Plastipak, Franklin Lakes). Após centrifugação a 166 x g por 15 minutos (para retirada do soro) os eritrócitos foram lavados 3 vezes com adição do tampão ringer lactato (cloreto de sódio 6 mg/ml +

cloreto de potássio 0,3 mg/ml + cloreto de cálcio 0,2 mg/ml + lactato de sódio 3 mg/ml). 10^8 eritrócitos humanos foram incubados com veneno (2,5, 5, 10 e 20 µg/ml) incubados previamente por 1h/37°C sob agitação. Após 24 horas a 37 °C sob agitação suave e constante “em roda mecânica”, as amostras foram centrifugadas a 166 x g por 5 minutos e, o sobrenadante lido a 570 nm no espectrofotômetro (microplatereader 550, BIORAD), as mesmas condições foram utilizadas por Chaves-Moreira et al. (2009).

Foram feitos dois experimentos individuais, em triplicata com controle negativo (solução tampão) e positivo (eritrócitos em água destilada ou 0,1% (v/v) de Triton X-100). Os valores de absorbância foram convertidos em porcentagem de hemólise usando o valor do controle positivo como 100% de hemólise.

5.13 REMOÇÃO DE COLESTEROL DE MEMBRANAS PLASMÁTICAS

Com o objetivo de analisar o papel dos *lipid rafts* na liberação de VEs, induzidas pelo veneno de *Li*, os eritrócitos foram pré-tratados com 2.5 e 10 mM de metil-β-ciclo dextrina (MβCD; Sigma), alíquotas preparadas de 100 mM (diluído em H₂O), adicional foram tratados com 10 µg/ml de *Li* durante 24 horas a 37°C, sob agitação delicada e constante. Após lavagem com lactato ringer, foram recoletados os sobrenadantes para avaliação de hemólise e quantificação de produção de VEs.

5.14 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS: IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA

Para a detecção de citocinas, o sobrenadante de 2×10^5 células THP-1 diferenciadas em macrófagos foi colhido, 2 e 24 h após tratamento com: 2, 10 e 40 µg/ml de Vesículas extracelulares derivadas da interação veneno loxosceles 10 µg/ml e Eritrócitos 40 µg / ml de Vesículas Extracelulares derivadas da interação de Lactato Ringer e eritrócitos 40 µg/ml de Veneno de *Loxosceles intermedia* 40 µg/ml de vesículas extracelulares derivadas da interação de PBS 1X com células THP1 Células incubadas com o meio de cultivo (controle negativo 100 ng/ml de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. A liberação de citocinas (IFN-γ, TNF-α, IL-6

e MCP-1/CCL2) foi avaliada usando o kit de TMB ELISA Development (PeproTech, EUA), de acordo com as instruções do fabricante

5.15 DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS THP-1 EM MACRÓFAGOS

Monócitos THP-1 em fase exponencial de crescimento ($5-8 \times 10^5$ células/ml) foram utilizados para o Ensaio de diferenciação para macrófagos. O protocolo de diferenciação foi adaptado de Lund *et al.* (2016). Células THP-1 foram tratadas com 15 ng/ml do agente indutor PMA diluído no meio RPMI. As células foram plaqueadas na densidade celular de 2×10^5 células/poço em placas de 24 poços e foram incubadas a 37°C, 5% CO₂, durante 48 h para promover a diferenciação. Após dois dias de exposição ao indutor, o meio com PMA foi removido e as células (diferenciadas) aderentes foram lavadas duas vezes com PBS estéril e uma vez com RPMI sem soro. Logo após, foi adicionado meio RPMI fresco e as células ficaram em repouso por 24 h, a 37 °C, 5% CO₂. Em seguida, as células THP-1 diferenciadas foram expostas aos tratamentos ou ao controle por 24 h. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C.

5.16 ENSAIO DE UPTAKE.

Células epiteliais e endoteliais foram plaqueadas em lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro ($1,5 \times 10^5$ células por lamínulas) e mantidas em cultura (37°C a 5% de CO₂) por 72 horas. As células foram expostas ou não (controle) as toxinas do veneno de *Loxosceles intermedia* (2,10 e 20 µg/ml), e tratamento com VEsE-Li e VES E-Lr. No caso as VES foram tratadas e marcadas previamente com CFSE durante 45 minutos, após da marcação as VEs foram ultra centrifugadas 100.000 g durante 90 min eliminando o sobrenadante e posteriormente o pellet suspenso em HEPES. Os tratamentos para as células estiveram mantidos por 1, 3, ou 24 horas, a 37°C, dependendo do ensaio. Após o período de tratamento, as células foram lavadas com PBS 1X e fixadas em solução de para formaldeído 2% em PBS (Sigma,USA) por 10min. Em seguida, foram lavadas com PBS1X três vezes, e

permeabilizadas como PBS 1X + TRITON X100 (0,5%), com incubação de 10 minutos. Após a incubação, foram realizados 3 procedimentos de lavagem com PBS 1X e na sequência, as lâminas foram coradas com solução de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) e faloidina alexa 594 (Thermofisher, EUA) 1:500 em PBS por 20 minutos. Depois as células foram lavadas com PBS por uma vez e montadas em lâminas histológicas com Fluoromont G (2:1 em PBS). O material foi analisado em microscopia de fluorescência convencional ou confocal. Para a fluorescência convencional foi utilizado o microscópio Axiophot (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) e para a fluorescência confocal foi utilizado o modelo (Nikon-Eclipse E800).

5.17 ENSAIOS DE FLUORESCÊNCIA E IMUNOFLUORESCÊNCIA

Células HEK 293 foram semeadas ($1,5 \times 10^5$ por poço) em lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro em placas de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) por 24 horas. No dia seguinte, as células foram lavadas e incubadas com meio RPMI sem soro. As células estiveram expostas 20 µg/ml e 2 µg/ml de veneno de *L. intermedia*, além disso microvesículas produzidas por *L. intermedia* em 20 µg/ml e 2 µg/ml, microvesículas de lactato de ringer 20 µg/ml e 2 µg/ml por 1 h a 37 ° C. As células foram então lavadas rapidamente com PBS 1 X por três vezes após foram fixadas com para formaldeído a 4% em PBS durante 10 min, após da fixação lavamos com PBS 1X três vezes, durante 10 minutos à temperatura ambiente e incubamos o iodeto de propídio 1 µg/ml. Para demonstrar a Interação do anticorpo com as células foram incubadas durante 1 h com veneno de *L. intermedia* 20 µg/ml, microvesículas com conteúdo de veneno de *L. intermedia* 20 µg/ml e EGTA (2mM/ml) e / ou anticorpo Limab7 criado contra toxinas de veneno (10 µg/ml) durante 1 h (37 ° C, 5% de CO₂), adicionado à cultura médio. Depois de Incubação, as células foram lavadas, bloqueadas de novo, como descrito acima, e tratadas com iodeto de propídio (1 µg/ml) durante 10 min. Para análise de controle positivo foi colocado triton x100 al 0,5% por 15 minutos e retirado, após foi lavado com PBS 1X colocado as mesmas condições com o marcador de iodeto de propídio Veneno durante 10 min a temperatura ambiente e preparado as lamínulas como descrito acima. Para

finalizar as células foram incubadas com DAPI (0,5 µg/ml) durante 5 min. Após a incubação, as amostras foram montadas com Fluoromount-G e observadas usando o microscópio de fluorescência confocal (Nikon-Eclipse E800).

5.18 ESTUDO IN VIVO

5.18.1 Avaliação da produção de vesículas extracelulares em camundongos desafiados com veneno de Li

Os camundongos utilizados nos experimentos foram fêmeas Swiss de 8 semanas de idade, provenientes do Biotério central do sector de Ciências Biológicas (BIO) da UFPR. Os animais foram mantidos no biotério e receberam água e ração sob condições ambientais controladas. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o guia para utilização de animais de laboratório e aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFPR, número 409.

Quatro camundongos receberam injeções subcutâneas de 100 µL de PBS (tampão fosfato 0,05 M e 0,015 M de NaCl, pH 7,4), contendo 1 µg/g peso de veneno de *Loxosceles intermedia*. Os camundongos foram divididos em dois grupos, onde o primeiro grupo (dois animais) os camundongos receberam o tratamento por 1 hora, e no segundo, (dois animais) os camundongos receberam tratamento por 4 horas. Após tratamentos foi extraído o sangue e em seguida os animais foram eutanasiados. Dois camundongos foram usados como controle e receberam só 100 µL PBS.

O soro foi separado do sangue depois da coleta por centrifugação à 400g por 5 minutos, depois o soro ficou a -20°C, as amostras de sangue foram centrifugadas por 5 minutos a 160 g, após esta centrifugação efetuadas as etapas de ultracentrifugação de acordo ao protocolo de centrifugação diferencial para obtenção de vesículas extracelulares

Depois da obtenção das VE, às amostras foi adicionado tampão HEPES e as mesmas foram quantificadas para conhecer a concentração de proteína total. As amostras contendo as vesículas extracelulares foram congeladas por 1 dia até a realização do ELISA.

O procedimento de ELISA foi realizado no formato sanduíche, o qual são realizadas duas etapas contendo anticorpos, intercaladas com uma etapa de incubação da amostra que se deseja determinar a concentração do antígeno.

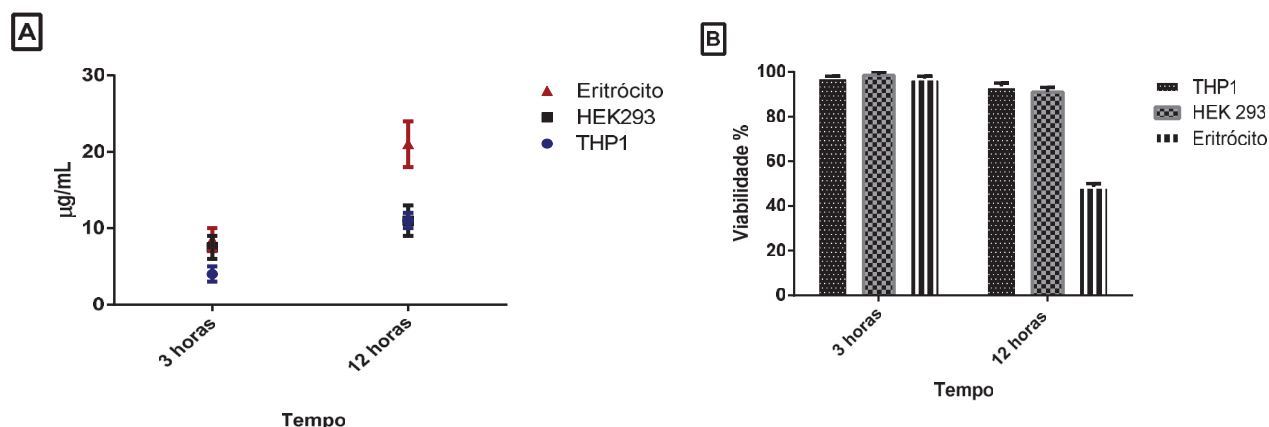
6. RESULTADOS

6.1. EFEITO DO VENENO DE *LOXOSCELES INTERMEDIA* SOBRE DIFERENTES LINHAGENS CELULARES.

O trabalho foi iniciado pelo contato do veneno de *Loxosceles intermedia* com diferentes linhagens celulares eucarióticas e na sequência, foi avaliado a capacidade de se liberar vesículas extracelulares. Na figura 1 podemos observar que todas as linhagens tiveram uma liberação de vesículas onde no período de três horas as células THP1, HEK e as células eritrócitos mostraram um rendimento similar. No período de 12 horas as células que tiveram uma maior concentração de proteínas foram os eritrócitos, seguido das células THP1 e HEK 293 com rendimento similar.

Com base nos resultados anteriores decidiu-se analisar o efeito tóxico do veneno através de avaliação da viabilidade celular (figura 1B). Como podemos observar as linhagens no período de 3 horas mostrarão uma resistência aos efeitos do veneno, por isso a liberação de microvesículas se manteve contínua neste período. Passado as 12 horas observamos que as células THP1 e HEK 293 apresentaram uma viabilidade de 95 e 92 % enquanto os eritrócitos diminuíram até um 50 % a viabilidade. no entanto tiveram uma maior liberação de vesículas extracelulares (figura 1A). Além disso, foi observado que as células THP1 e as células HEK 293 tiveram uma viabilidade de 80 %, o que permitiu uma liberação constante de vesículas extracelulares

FIGURA 1: VESICULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DA INTERACAO DE DIFERENTES LINHAGENS DE CELULAS COM VENENO DE *Loxocsesles intermedia*.

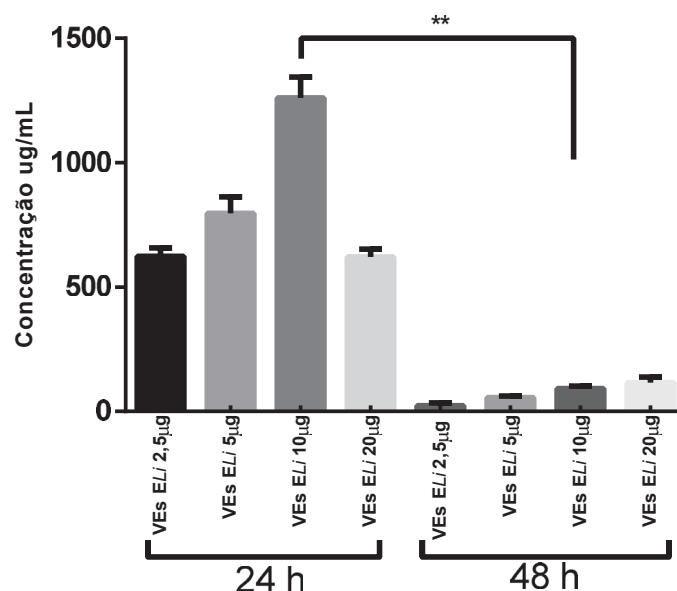


FONTE: O autor (2017)

NOTA: 1A) A interação de diferentes células (HEK 293, ERITROCITOS, THP1) tem diferentes níveis de liberação de VEs. Todas as células ($1 \times 10^5/\text{ml}$) foram incubadas durante 3h e 12 h com veneno de Li (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Foi determinada a concentração de proteína detectada no pellet (VEs) após ultracentrifugação mediante o ensaio de Bradford. Os valores apresentados correspondem as médias \pm o desvio padrão de dois experimentos independentes 1B) apresentação gráfica da Viabilidade celular dos diferentes tipos celulares na interação com veneno. As células Hek 293 e Thp1 foi utilizado método de azul de tripano, eritrócitos foram avaliados mediante contagem de células.

Como foi demonstrado nos experimentos anteriores, os eritrócitos foram mais responsivos na liberação de vesículas extracelulares quando estava exposto ao veneno. Então decidiu-se escolher um tipo de linhagem celular para continuar com os experimentos e optou-se pelos eritrócitos, já que representam um modelo interessante que simula o contato do veneno como o organismo. Por estas razões foi necessário estabelecer as condições ótimas para obtenção de uma maior liberação de VEs aumentando a concentração de células, para serem usados em experimentos posteriores. Na figura 2 podemos observar uma liberação dose dependente desde 2,5 até 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, onde a concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de veneno observamos uma diminuição na liberação de VEs devido ao aumento de hemólise dos eritrócitos. No caso do tempo de 48 horas, também foi visto uma liberação discreta de VEs de maneira dose dependente, possivelmente pelo aumento de hemólise em comparação com 24 horas. A concentração que foi estabelecida para os seguintes experimentos foi de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pois foi a condição onde os eritrócitos conseguiram uma melhor liberação de VEs.

FIGURA 2 VARIAÇÃO NA LIBERAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE ERITRÓCITOS TRATADO COM VENENO Li



FONTE: O autor (2016, 2017)

NOTA: Eritrócitos 1×10^8 /ml foram incubados a 37°C sob agitação suave, por 24 ou 48 horas em presença de diferentes concentrações de veneno *Li* (2,5, 5, 10 e $20 \mu\text{g/ml}$). Foi determinada a concentração de proteína detectada no pellet (VEs) após ultracentrifugação mediante o ensaio de Bradford. Os valores apresentados correspondem as médias \pm o desvio padrão de três experimentos independentes, **o valor- $p < 0,05$.

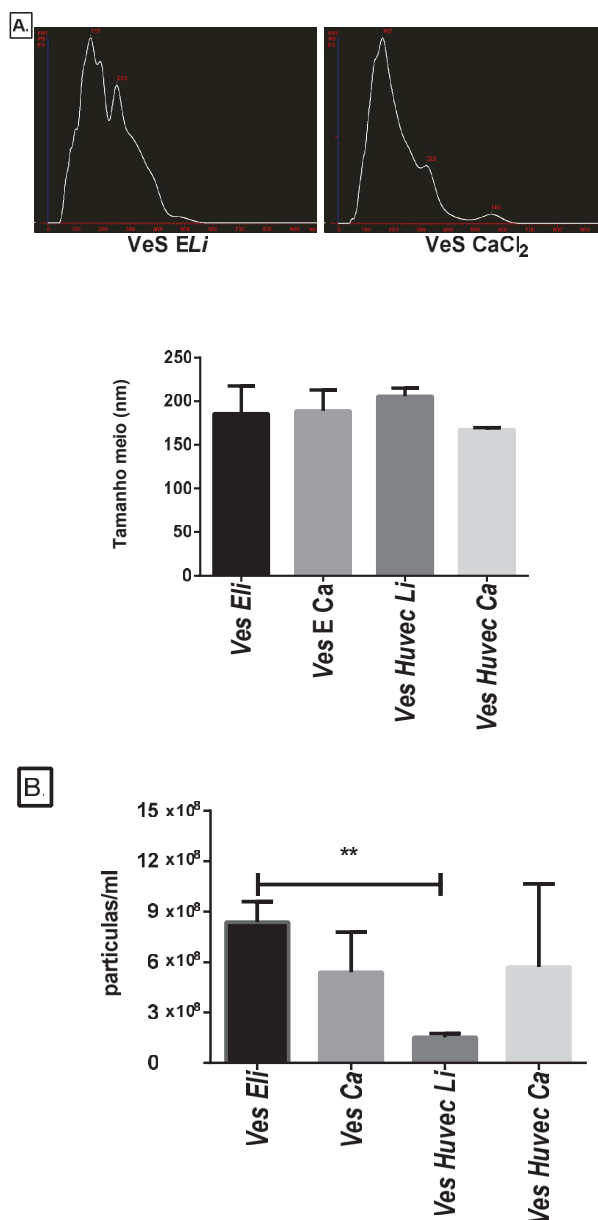
6.2 CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

6.2.1 Análise de VEs utilizando *Nanosight*

A natureza das vesículas extracelulares foi analisada utilizando *Nanosight*, que permite a obtenção da distribuição do tamanho das vesículas em uma suspensão, através do estudo do movimento browniano. As análises mostraram que o tamanho médio das vesículas celulares corresponde em sua maioria a vesículas extracelulares (acima de $100 \mu\text{m}$), foram utilizadas células Huvec e eritrócitos para liberação de VEs no estímulo de veneno e do indutor CaCl_2 , figura 3A. O resultado do nanosight permitiu estabelecer a população de vesículas extracelulares, demonstrado pelo tamanho médio de todas as populações VEs, além disso, no gráfico 3B foi observado que as VEs dependentes da interação com veneno tiveram um

maior numero de partículas, liberando mais vesículas que as produzidas a partir do estímulo do cloreto de Calcio.

FIGURA 3: CARACTERIZAÇÃO POR NANO SIGHT



FONTE: O autor (2017)

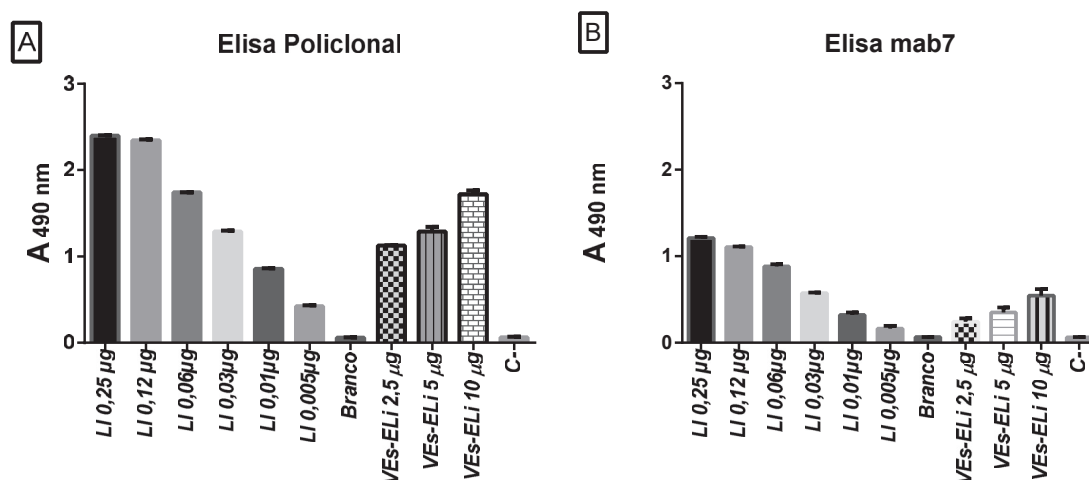
NOTA 3A) Representação gráfica da análise pelo Nanosight demonstrando que o tamanho médio das VEs de todas as amostras é entre 160-200 nm. Situado na parte superior da figura, são gráficos representativos gerados diretamente do programa do Nanosight mostrando o perfil das distribuições de tamanho de VEs nas diferentes amostras. O eixo X é o tamanho (0-1000 nm) e o eixo Y, a concentração, partícula/ml. No segundo gráfico a comparação do tamanho meio das VEs com os

diferentes indutores (Veneno *Li*, CaCl_2). **3B)** Gráfico mostrando a concentração de partículas/ml VEs em cada amostra. As VEs derivadas da interação Eritrócito-*Li* produziram a maior número de partículas/ml comparadas com as demais VEs. As VEs, derivadas da interação de veneno e CaCl_2 tinham o dosagem de proteínas ($320\mu\text{g/ml}$). Os dados representam as médias e desvio-padrões de dois experimentos independentes, **o valor-p <0,05.

6.2.2. Caracterização das microvesículas através de imuno ensaios.

Uma vez confirmado que a interação de eritrócitos e veneno liberam VEs decidiu-se analisar a presença de componentes do veneno nas microvesículas. Para avaliar esses componentes foram utilizados os anticorpos policlonais anti-*Li*-horse, que reconhecem diferentes componentes do veneno de *Loxosceles intermedia*, e o anticorpo monoclonal Limab7 (Alvarenga 2003), que reconhece um componente específico, a esfingomielinase D. O primeiro ensaio utilizado foi ELISA sanduiche que permite a detecção de veneno entre os componentes presentes nas microvesículas produzidas a partir da interação do veneno com os eritrócitos. Na figura 4 observa-se que as vesículas extracelulares foram detectadas pelos dois anticorpos, o que sugere que algumas das toxinas do veneno foram capazes de interagir e ser contidas nas VEs liberadas pelos eritrócitos. Além disso, pode-se observar uma maior reatividade por parte do anticorpo policlonal Anti-*Li*, possivelmente pela detecção de mais de um componente do veneno. No entanto, a detecção por parte do anticorpo monoclonal mab7 sugere uma participação ativa por parte da toxina esfingomielinase D, por meio dos resultados do ELISA foi calculado uma porcentagem estimado dos componentes de veneno nas Vesículas Extracelulares tabela 2

FIGURA 4: CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DE COMPONENTES DE VENENO ATRAVÉS DE ELISA SANDWICHE.



FONTE: O autor (2016)

NOTA. A.) Absorbância resultante da interação entre IgG de cavalo anti-loxocelos com amostras contendo vesículas extracelulares Eritrócito expostas a diferentes concentrações de *Loxosceles intermedia* (VES-ELi) colocando 2 µg/ml,. Foram usadas concentrações conhecidas de veneno (0,25µg/ml, 0,12µg/ml, 0,06µg/ml, 0,03µg/ml) como curva padrão . E vesículas extracelulares de THP1+2mM CaCl₂. Como controle negativo. B.) Absorbância resultante da interação entre Limab7 com amostras contendo vesículas extracelulares Eritrócito expostas a diferentes concentrações de *Loxosceles intermedia* (VES-ELi) colocando 2 µg/ml,. Foram usadas concentrações conhecidas de veneno (0,25µg/ml, 0,12µg/ml, 0,06µg/ml, 0,03µg/ml) como curva padrão . E vesículas extracelulares de THP1+2mM CaCl₂. Como controle negativo. Os valores correspondem a média ± SEM de dois experimentos independentes feito em duplicata

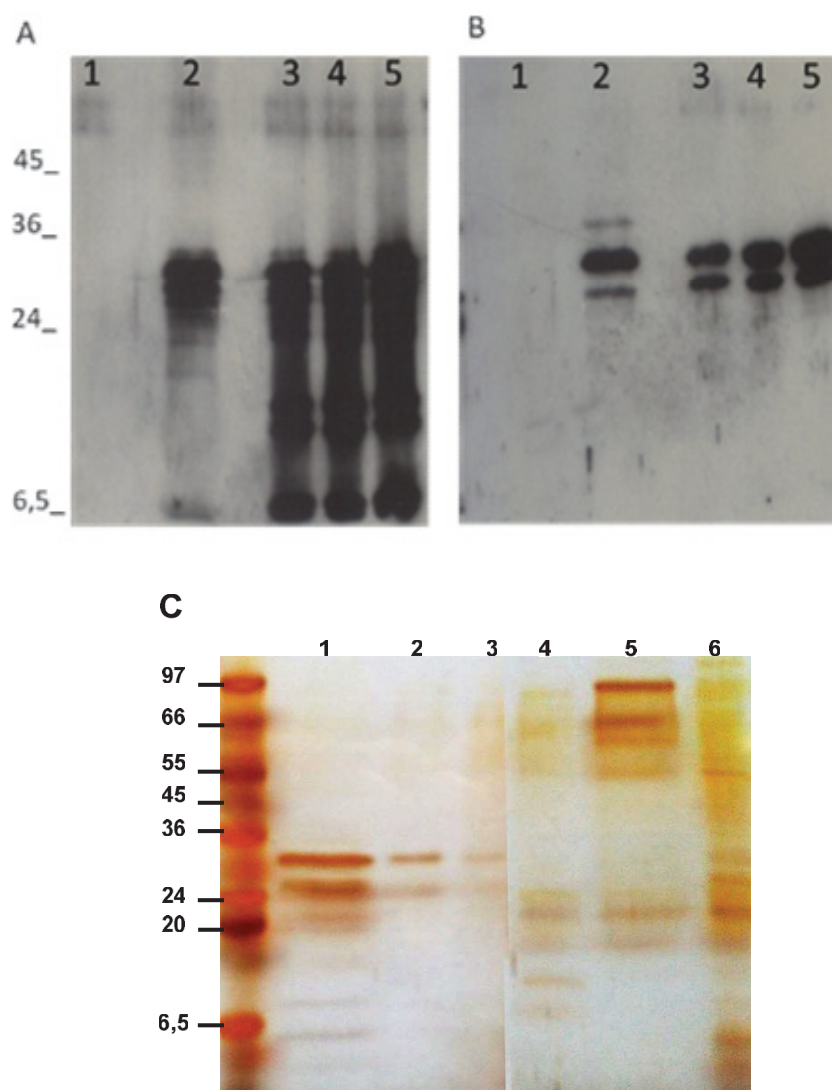
TABELA 2 – PORCETAGEM DE VENENO NAS VES

AMOSTRA	PORCETAGEM VENENO
VEs E - Li 2,5µg	± 3 - 5 %
VEs E - Li 5µg	± 1 -1,5 %
VEs E - Li 10µg	± 0,5 – 1%

FONTE: O autor (2017)

Na tentativa de caracterizar melhor qual é o componente presente nas vesículas que está reagindo com esses anticorpos foi analisado o extrato total de proteínas do veneno através de um *western blotting*. Na figura 5A e 5B podemos observar a detecção de várias bandas entre os tamanhos de 6,5 e 45KDa, o que sugere a presença de algumas toxinas descritas para o veneno. Na figura 5A, foi utilizado o anticorpo policlonal anti-*Li* horse e foi detectada a presença de diferentes bandas que pertencem a toxinas do veneno com uma intensidade maior no tamanho de 32 a 35 Kda o que representaria a esfingomilina D. O seguinte experimento foi realizar outro *western blotting* para ser revelado com o anticorpo monoclonal Limab7(Alvarenga et al 2003) que reconhece especificamente a presença de esfingomilina D, responsável pelos principais efeitos deletérios do veneno. Nesta revelação detectamos a presença desta proteína nas VEs produzidas pela interação eritrócito com veneno. Por outro lado, não fomos capazes de observar a presença de toxinas nas VEs induzidas por CaCl_2 . Posteriormente observamos na figura 5C o gel de poliacrilamida compara o perfil de diferentes concentrações de veneno *Li* com as VEs *ELi* , VEs CaCl_2 e com o extrato celular de eritrócitos. No gel foi evidenciado que as VEs liberadas a partir da interação com veneno possuem componentes que tem uma migração eletroforetica similar a componentes do veneno e também apresentam componentes próprios dos eritrócitos. As VEs obtidas a partir da interação com CaCl_2 não possuem nenhum componente do veneno.

FIGURA 5: WESTERN BLOTTING E ANALISE ELETROFORETICO DE VES DE ERITRÓCITOS



FONTE: O autor (2016,2017)

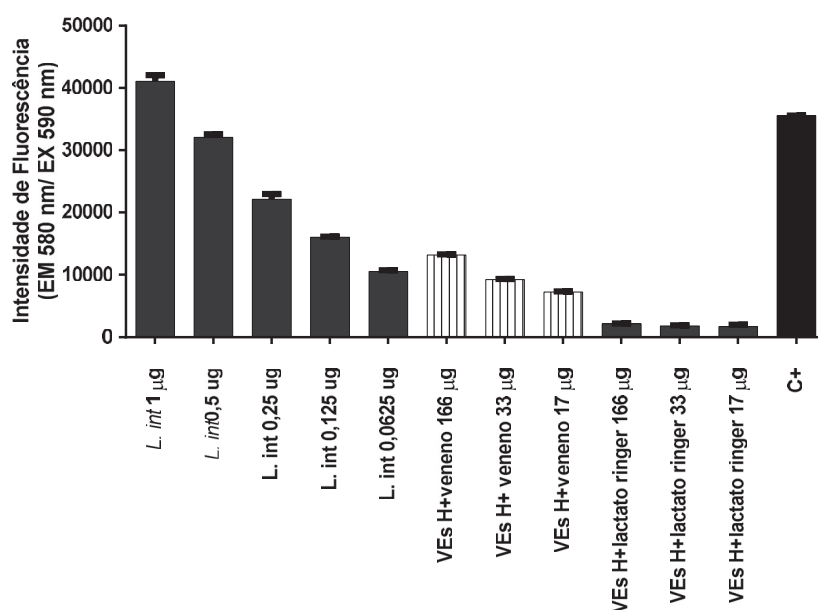
NOTA: 5A) análise de extratos WB linha 1. VEs de eritrócitos tratadas com CaCl_2 1 μg proteína total; linha 2. VEs de eritrócitos expostos a *L.i* 1 μg proteína total, linhas 3-5 concentrações conhecidas de veneno respectivamente (0,5 μg , 1 μg , 2 μg), revelados na membrana com anti *Li* hrp (1: 1500) 5B) linha 1. VEs de eritrócitos tratadas com CaCl_2 1 μg proteína total; linha 2. VEs de eritrócitos expostos a *L.i* 1 μg proteína total, linhas 3-5 concentrações conhecidas de veneno respectivamente (0,5 μg , 1 μg , 2 μg) revelados com com limab7 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e anti mouse hrp (1:4000) 5C) gel de policramida 12,5 %, com extratos nas linhas 1-3 concentrações de veneno respectivamente (2, 1, e 0,5 μg), linha 4 VEs E- CaCl_2 (5 μg de proteína total), linha 5 Extrato de eritrócito 5 μg de proteína total e linha 6. VEs E-*Li* (5 μg de proteína total), revelado com nitrato de prata.

6.3 EFEITO BIOLÓGICO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

6.3.1 Atividade esfingomielinásica das microvesículas de eritrócitos derivadas da exposição ao veneno de *Loxosceles intermedia* com eritrócitos

Uma vez confirmada a presença de toxinas de veneno nas VEs, na sequência, foi avaliada a atividade enzimática de esfingomielina presente nas mesmas. Na figura 5 está representada a atividade enzimática de diferentes concentrações do veneno de *Li*, e de VEs-E-*Li*, assim como controles de VEs obtidas pela incubação de eritrócitos somente com tampão ringer VEs-LR. Através da detecção enzimática da esfingomielinase foi demonstrado pela primeira vez que VEs poderiam conter a enzima esfingomielinase ativa, apresentando um papel biológico de propagação dos efeitos do veneno.

FIGURA 6: ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA *IN VITRO*.



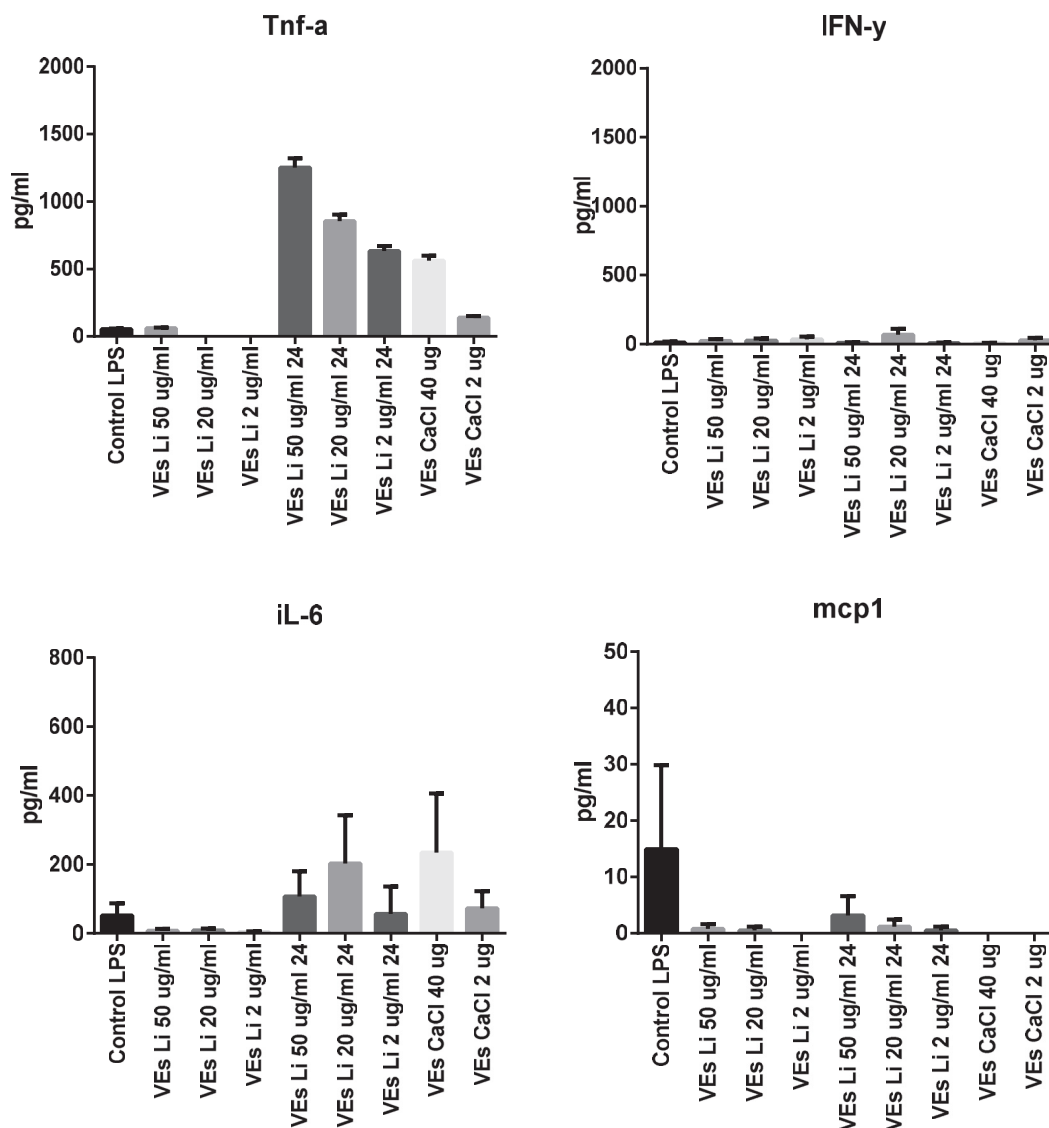
FONTE: O autor (2017)

NOTA: Representação da Atividade de esfingomielinase do veneno total de *Loxosceles intermedia* (1 µg/mL) e Vesículas Extracelulares através do Kit Amplex Red. Curva de atividade com Concentrações veneno *Li* (1 µg/mL-0,0625 µg/mL), concentrações de VEs-*Li* (166µg/ml, 33 µg/ml, 17 µg/ml de proteína total) que corresponde absorbâncias do Elisa sandiwch (5µg/ml, 1 µg/ml e 0.5 µg/ml de veneno *Li*), concentrações de VEs-Lr (166µg/ml, 33 µg/ml e 17 µg/ml). Controle negativos e positivos descrito no Kit. Incubação a 37 °C por 30 minutos ao abrigo da luz. A fluorescência foi medida num leitor de microplacas utilizando excitação a 550 nm e emissão a 590 nm. Os valores correspondem a média ± SEM de um ensaio feito em triplicata.

6.3.2 Indução de resposta imune: liberação de citocinas durante o contato de VEs e THP1

Para avaliar se as VEs-*Eli* tem a capacidade de induzir uma liberação de citocinas IL6, Inf-γ, tnf-α e mcp1 que foram testadas e descritas no contexto de loxoscelismo (HORTA *et al* 2013., BARBARO *et al* 2010., SOUZA *et al* 2008). As VEs foram colocadas em interação com macrófagos diferenciados a partir de células THP1 por 48 horas na presença de PMA 15 ng/ml. As células diferenciadas foram tratadas com estímulo de VEs-*Eli* 2, 20 e 50 µg/ml e VEs CaCl₂ como controles em 4 e 24 h. O aumento na produção de citocinas foi determinado no sobrenadante das células mediante ELISA. Observamos que as citocinas IL6 e Tnf α, foram liberadas a partir das 24 h, no caso de IL6 a concentração que induz uma maior liberação foi 40 µg de VEs CaCl₂, seguido pelas VEs-*Eli* com 20 µg. No caso do TNFα houve uma indução de liberação de VEs-EL *ide* maneira dose dependente confirmando uma indução de liberação de citocinas nos macrófagos a partir da interação de VEs. Adicionalmente na medição de INF-γ foi possível observar um leve aumento por parte de interação de VEs com as células. Finalmente a citocina MCP1 apresentou só um aumento na VEs-*Eli* após de 20 e 50 µg.

FIGURA 7: INDUÇÃO DE CITOCINAS DURANTE A INTERAÇÃO DE MACRÓFAGOS COM VEs *ELi*



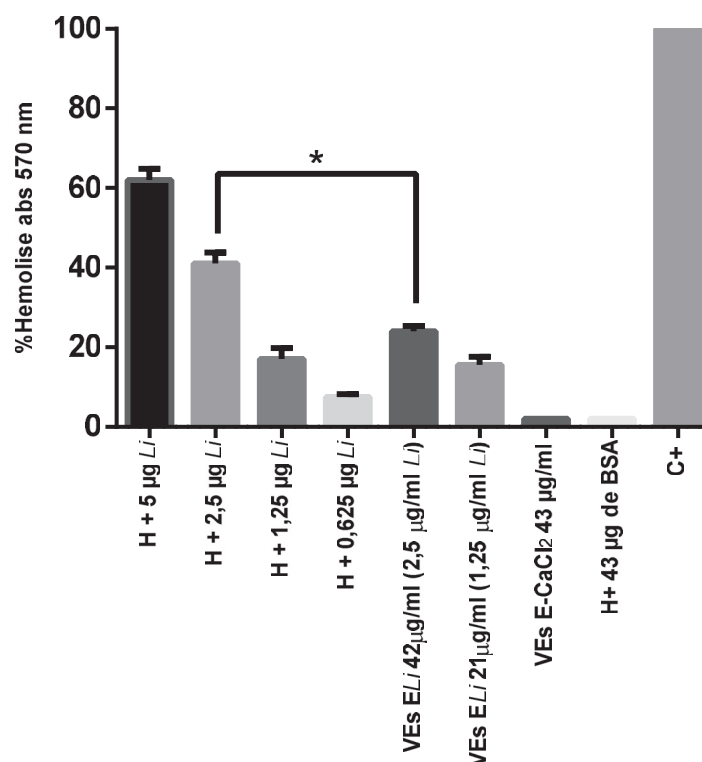
FONTE: O autor (2017,2018)

NOTA: Macrófagos (células THP-1 diferenciadas) foram incubadas com VEs Li nas concentrações de 50, 20 e 2 μ g/ml (proteína total), e com VEs-LR nas concentrações 40 e 2 μ g/ml (proteína total). Controle positivo Lipopolissacarídeo (100 ng/ml) de *E. coli*, durante 24 h. Controle negativo células incubadas apenas com o meio de cultura. A medição de citocinas foi feita usando um *kit* comercial de ELISA (PeproTech, EUA). Os dados representam a média \pm SEM de um ensaio feito em triplicata.

6.3.3 Ensaio de Hemólise produzido pelas vesículas extracelulares

Depois de confirmada a presença de toxinas nas VEs, foi avaliada a capacidade destas em induzir hemólise dos eritrócitos. Como pode ser observado na Figura 8, as concentrações 1.25 e 2.5 μg de VEs-ELi foram capazes de induzir hemólise. VEs-ELR e VEs-CaCl₂ não apresentaram o mesmo efeito quando foram usadas as mesmas concentrações de proteínas. Como controle positivo foi utilizado veneno de *Li* em diferentes concentrações. Adicionalmente tanto o veneno quanto as VEs-ELi tiveram um efeito dose/dependente.

FIGURA 8: ENSAIO HEMOLÍTICO NA PRESENÇA DE VEs



FONTE: O autor (2017)

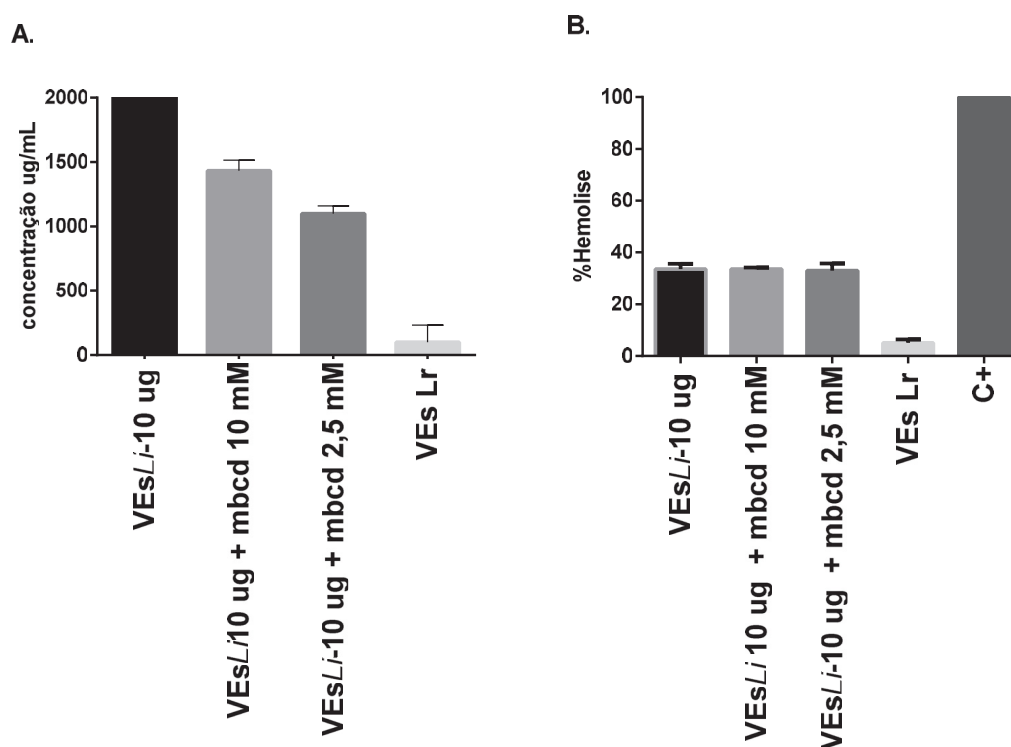
NOTA: Eritrócitos $1 \times 10^8/\text{ml}$ tratadas com concentrações do veneno de *Li* (5, 2.5, 1.25 e 0.625 $\mu\text{g/ml}$). VEs-ELi contendo, 42,5 μg e 21,2 μg de proteínas totais ou (2,5 $\mu\text{g/ml}$ e 1,25 $\mu\text{g/ml}$ de *Li* determinado pelo técnica de ELISA sândwich). VEs-CaCl₂ concentração de 43 μg . Eritrócitos em interação com 40 μg proteína BSA (C-). Incubação a 37 °C por 24 h sob agitação suave. Porcentagem de

reatividade determinado utilizando os valores do (C+) controle positivo (Triton X-100) como 100% de hemólise. Lactato ringer foi usado como controle negativo (C-). A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm. Os dados representam a média \pm SEM de dois experimentos independentes. *o valor-p $<0,05$.

6.3.4 Colesterol envolvido na liberação de VEs

As bolsas lipídicas ou “*lipidrafts*” são micro domínios da membrana plasmática com uma composição de diferentes lipídios e proteínas, ricos em colesterol principalmente, estão envolvidas na sinalização celular, e podem estar envolvidas na liberação e produção de vesículas extracelulares. As VEs derivadas das membranas plasmáticas contêm fosfatidilserina, produto do processo de translocação de fosfolipídios da membrana plasmática após do estímulo de indução da vesiculação. Diferentes autores (Evans Osses 2015, Del conde 2005) mostraram que o esgotamento do colesterol por meio do metil beta ciclo dextrina (m β cd) diminui a liberação de microvesículas. Por estas razões optou-se por determinar se o m β cd seria capaz de inibir a liberação de VEs nos eritrócitos em contato com veneno. Na figura 11A foi identificada que a liberação de vesículas extracelulares foi inibida na presença de m β cd, e o efeito foi dose dependente, no qual a maior concentração de m β cd levou redução na liberação das microvesículas. Além disso, identificamos no gráfico B que o m β cd não induziu aumento da hemólise, confirmando seu caráter não citotóxico nestas condições.

FIGURA 9: ESGOTAMENTO DE LIPIDS RAFTS ENVOLVIDOS NAS VEs



FONTE: O autor (2017)

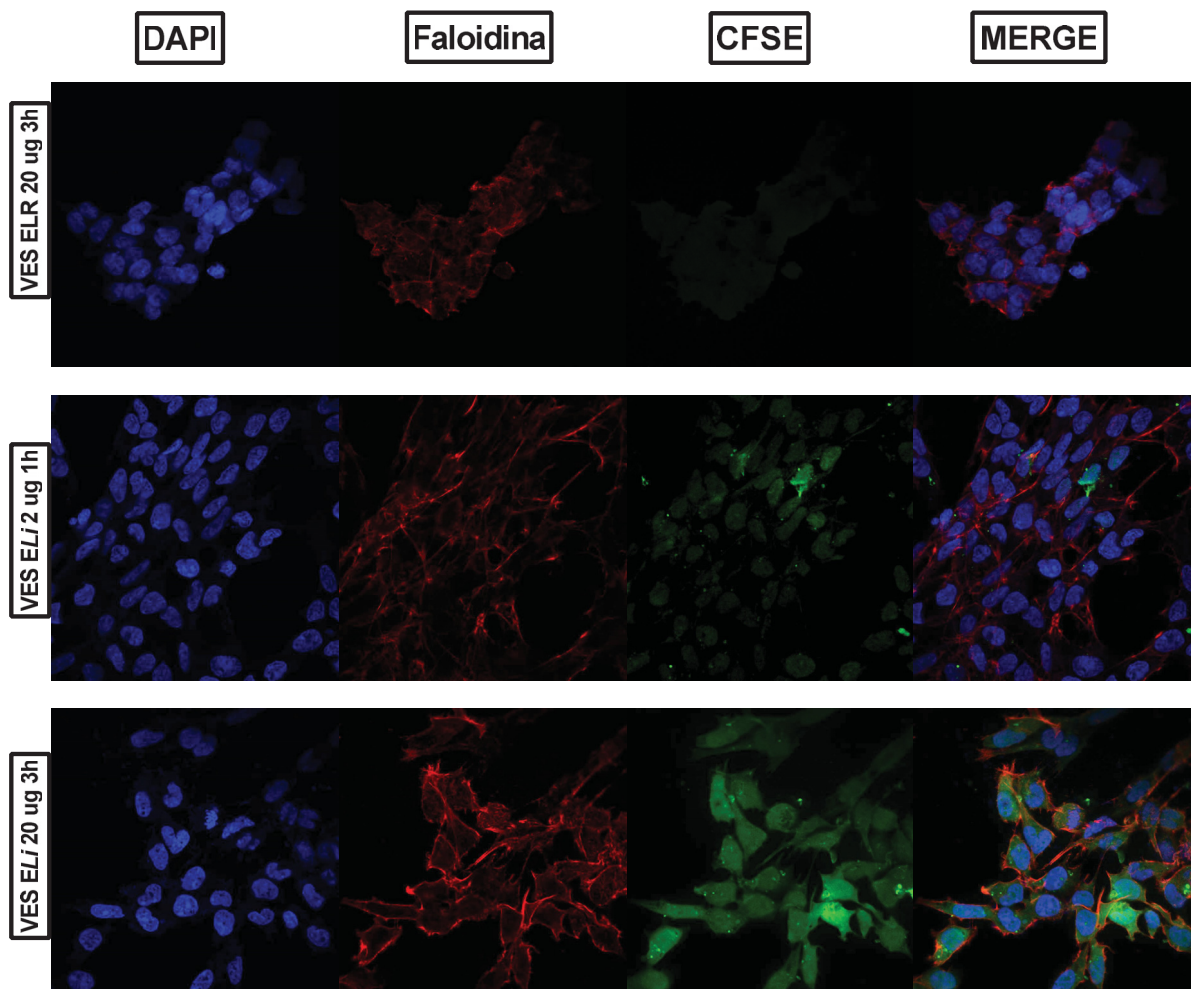
NOTA: Eritrócitos 1×10^8 /ml tratados com diferentes doses de MBCD 2,5 e 10 mM, e posteriormente incubados com veneno *L. intermedia* 10 μ g/ml por 24 horas, sob agitação suave. Depois das 24 horas os sobrenadantes foram avaliados para determinar hemólise por porcentagem e posteriormente ultracentrifugados para quantificar proteínas das VEs. As condições foram testadas em duplicata.

6.4 EFEITO DAS VES CONTENDO COMPONENTES DO VENENO SOBRE A MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS HEK

Como foi apresentado anteriormente, as VEs-ELi tem diferente atividade biológica *in vitro* sobre os eritrócitos. Portanto avaliamos a possibilidade de interação das VEs sobre as células HEK 293. Para isso, as células foram marcadas com dapi (marcador de núcleo) e faloidina (marcador de actina) para ter uma possível localização das vesículas, as quais foram marcados com CFSE (que marca VEs membrana plasmática e proliferação celular), todas as Vesículas foram marcadas de acordo ao item 4.16. Na figura 8 podemos observar que para a marcação de dapi e faloidina temos uma formação e morfologia típica de células epiteliais. No tratamento com VEs E-Li mostrou-se um processo de interação das

vesículas extracelulares com as células devido a internalização, permite observar uma distribuição em diferentes partes das células. Além disso podemos observar uma marcação dependente do tempo.

FIGURA 10: UP-TAKE MICROVESÍCULAS ERITRÓCITOS CÉLULAS HEK 293.



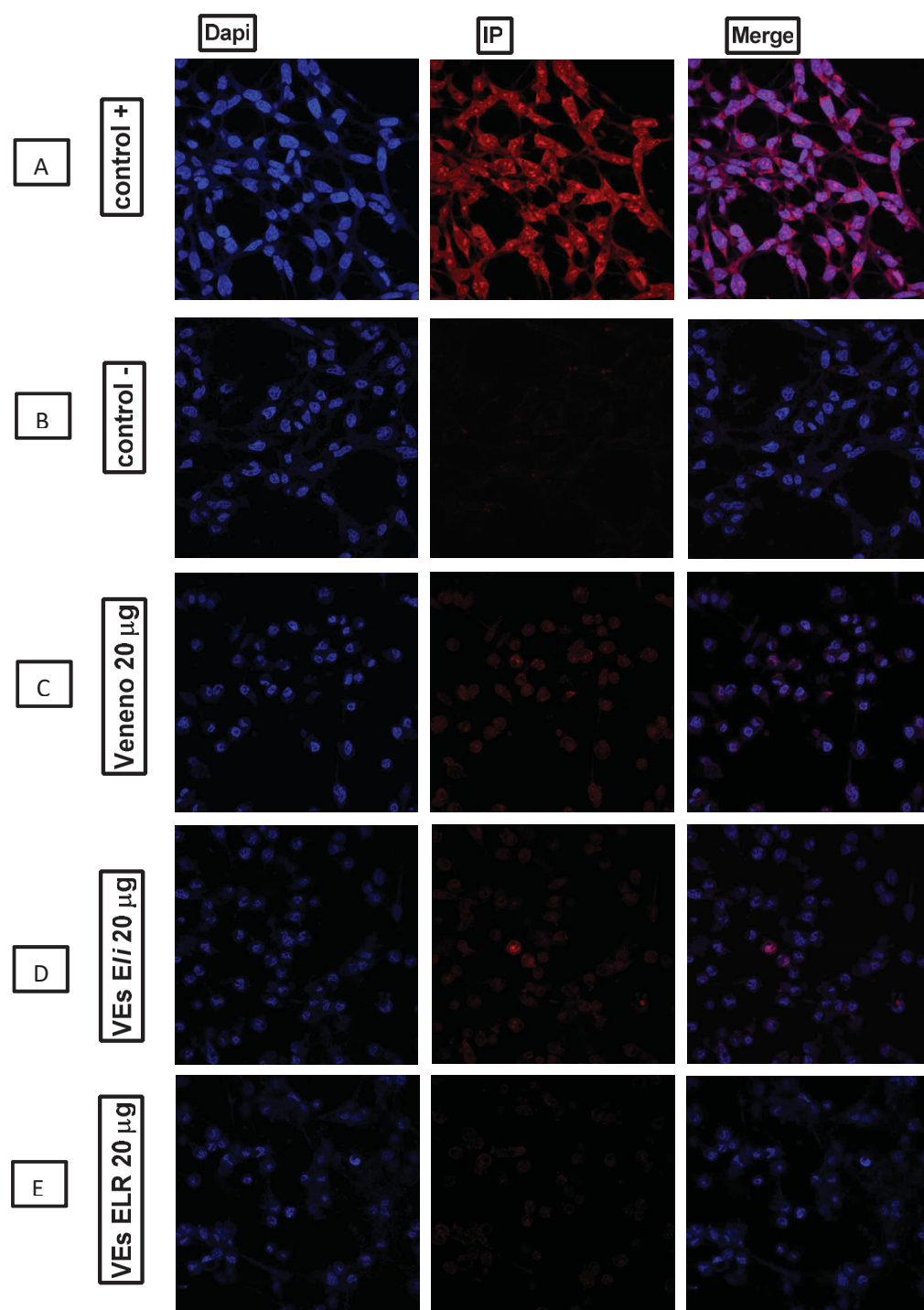
FONTE: O autor(2017)

NOTA: Representação gráfica de Células HEK 293 1×10^5 /poço com 2 dias de plaqueamento foram mantidas na presença de VEs-ELi (20 e 2 $\mu\text{g/ml}$) VEs-LR (20 $\mu\text{g/ml}$) por 3 horas a 37°C , 5% de CO_2 . Se utilizo como marcador celular DAPI e FALOIDINA, marcador de VEs CFSE.

6.5 EFEITO DAS MICROVESÍCULAS NA ALTERAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICAS.

No experimento as células tratadas tanto com veneno ou com VEs apresentaram aumento na permeabilidade da membrana celular verificado pela internalização do iodeto de propídio (corante vital só penetra com alterações de membrana), sugerindo que a toxina tem um efeito deletério importante sobre a membrana. Na Figura 9 pode-se observar a internalização de iodeto de propídeo de maneira dose dependente tanto nas células tratadas com veneno tanto com as VEs-*E. Li*. Células tratadas com VEs-Ringer tiveram um efeito leve. Como controle positivo para desestabilização da membrana foi usado detergente Triton X100 0,5%.

FIGURA 11: INTERNALIZAÇÃO DE IODETO DE PROPÍDEO EM CÉLULAS HEK 293 TRATADAS COM VENENO E VES

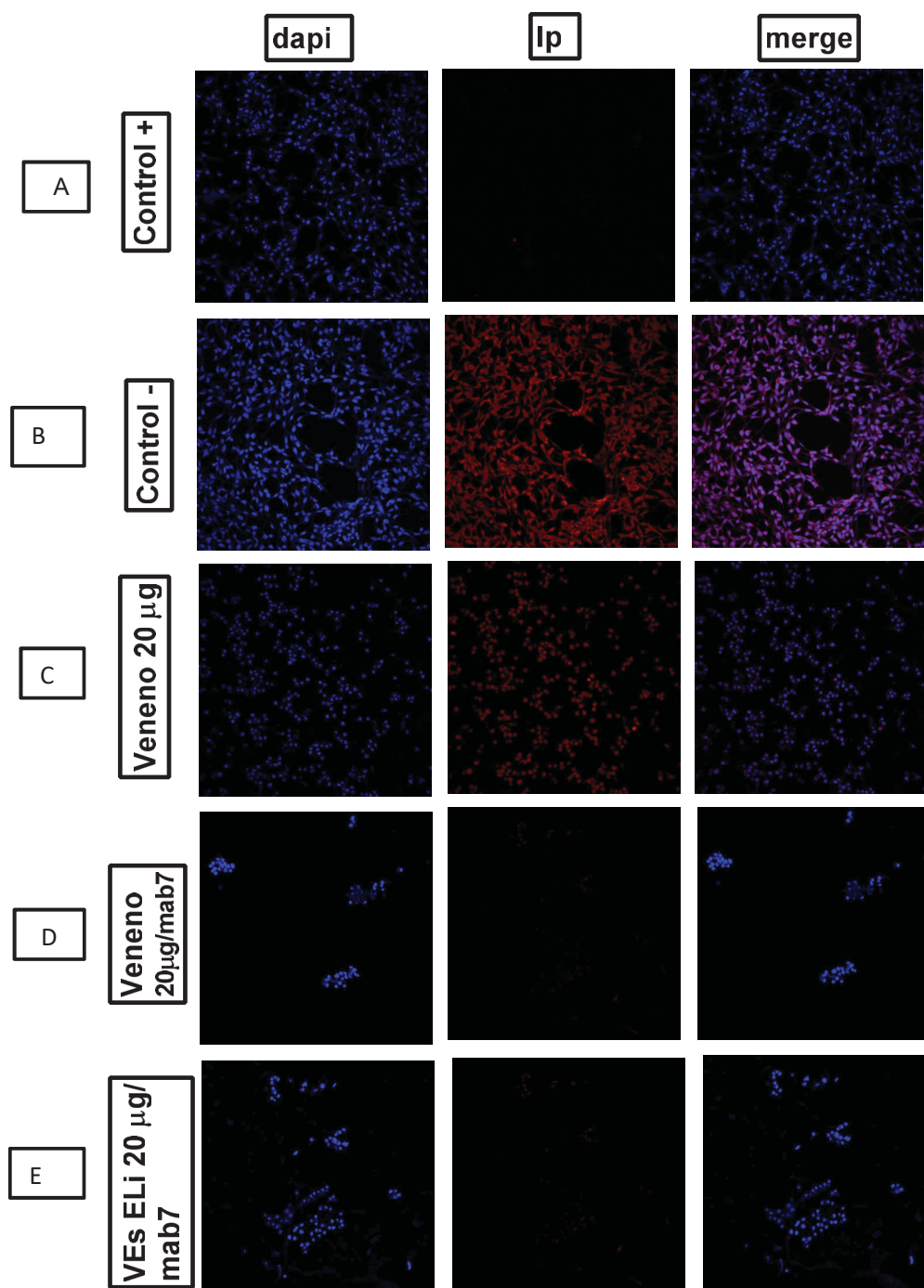


FONTE: O Autor (2017)

NOTA: células HEK 293 1×10^5 por poço, na presença do veneno de *Loxosceles intermedia* (20µg/mL), VEs-ELi (20 µg/ml), VEs-ELR (20 µg/ml) por 3 horas a 37°C, 5% de CO₂. 11A) controle positivo triton X100 11B) controle negativo sem tratamento 11C) veneno Li 20 µg/ml 11D) veneno Li 2 µg/ml 11E) VEsE-Li 20µg/ml. 11F) VEsE-Li 2µg/ml 11G) VEs E-LR 20µg/ml, em presença de iodeto de propídio ensaio realizado por 3 horas. Ensaio feito por fluorescência.

5.6 EFEITO NEUTRALIZANTE DO ANTICORPO MONOCLONAL LI MAB7 NA INIBIÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE MEMBRANA EM CÉLULAS HEK293 TRATADAS COM VENENO E VES.

Devido aos resultados anteriores fomos a utilizar mab7 como possível neutralizante dos efeitos deletérios do veneno e das VEs. Nas células HEK 293 que foram tratadas com veneno ou com VES-ELI 2 E 20 µg foi possível observar alteração nas membranas pela permeabilização do iodeto de propídio (IP), mas esse efeito foi inibido na presença do Limab7 conforme na visualizado na figura 10. Além de verificar a ação do anticorpo, as células foram tratadas com EGTA 2mM com o intuito de inibir a maquinaria de reparação de membrana que é Ca dependente, já que (Atanasoff *et al* 2014) demonstraram a capacidade de reparo da membrana nas células epiteliais. Nas células que foram adicionados EGTA houve uma maior permeabilização do IP nas condições em que foram adicionadas as VES e Li, comparadas com as células em que não foram adicionadas o EGTA ao meio. Neste ensaio foi possível confirmar o efeito de neutralização do anticorpo mab7.

FIGURA 12: INIBIÇÃO DO EFEITO DE *Li* E VES-*Li* NA PRESENÇA DE ANTICORPO ESPECIFICO

FONTE: O autor (2017)

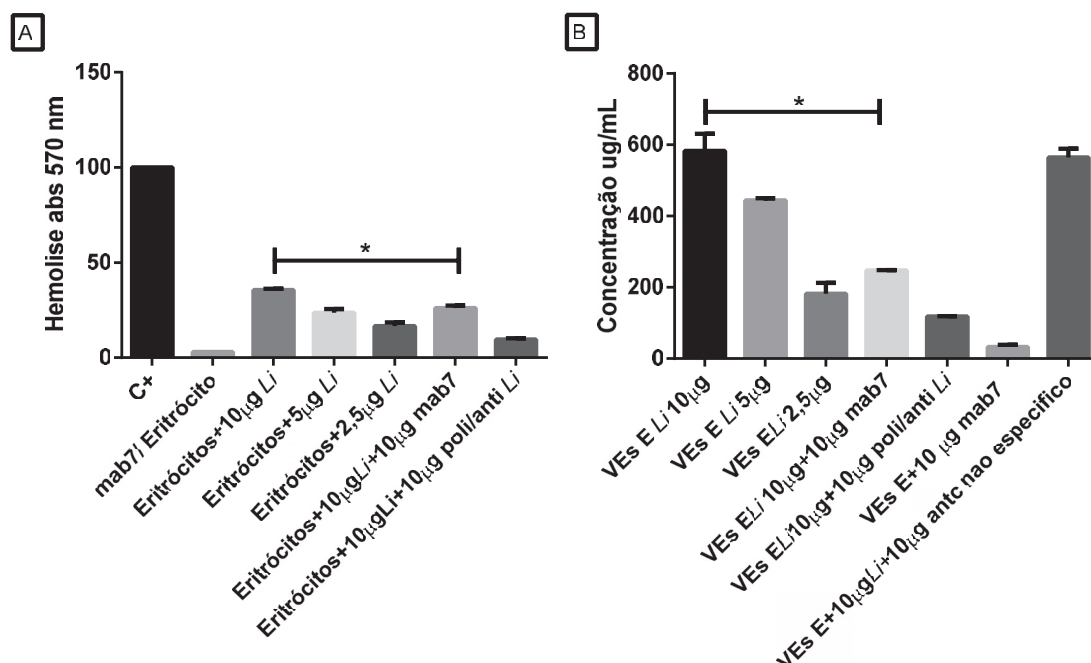
NOTA: Purificação de vesículas extracelulares da interação com eritrócitos e veneno *L.i* incubadas com células HEK 293 1×10^5 por poço durante 3 horas. Em 12A) Controle positivo triton x 100 0,5 %

15 min; 12B) Controle negativo sem tratamento; 12C) Veneno *Li* 20 µg/ml ; 12D) Veneno *Li* 20 µg + 2 mM EGTA; 12E) VEsE-*Li* 20 µg + 2 mM EGTA.

5.7 EFEITO NEUTRALIZANTE DO MAB7 NA LIBERAÇÃO DE VES E NA HEMÓLISE DO ERITRÓCITO.

Foi avaliado se a presença de anticorpo monoclonal mab7 poderia diminuir ou inibir a liberação de VEs nos eritrócitos. Além disso, avaliamos atividade de inibição do anticorpo verificado pela hemólise. Na figura 12 A, foi visto que o anticorpo mab7 diminuiu a atividade hemolítica do veneno em 10%, no entanto o anticorpo controle policlonal inibiu a atividade em 20%, mostrando assim que os anticorpos possuem um efeito protetor nas células expostas ao veneno. Posteriormente, no gráfico 12b, foi verificada uma redução na liberação de VEs. Eritrócitos na presença de veneno 10 µg de *Loxosceles intermedia* e de anticorpo, 10 µg monoclonal mab7, liberaram uma quantidade menor de VEs comparados com a liberação de VEs em contato direto de Veneno *Li* na concentração de 10 e 5 µg. Do mesmo modo, o anticorpo policlonal anti-*Li* foi capaz de reduzir significativamente a liberação de Vesículas extracelulares. É importante ressaltar que o efeito protetor dos anticorpos foi específico a interação com toxinas loxoscelicas pois foi provado um anticorpo inespecífico e ele não conseguiu diminuir a hemólise nem a liberação das vesículas extracelulares.

FIGURA 13: LIBERAÇÃO DE VES-Li NA PRESENÇA DE ANTICORPOS

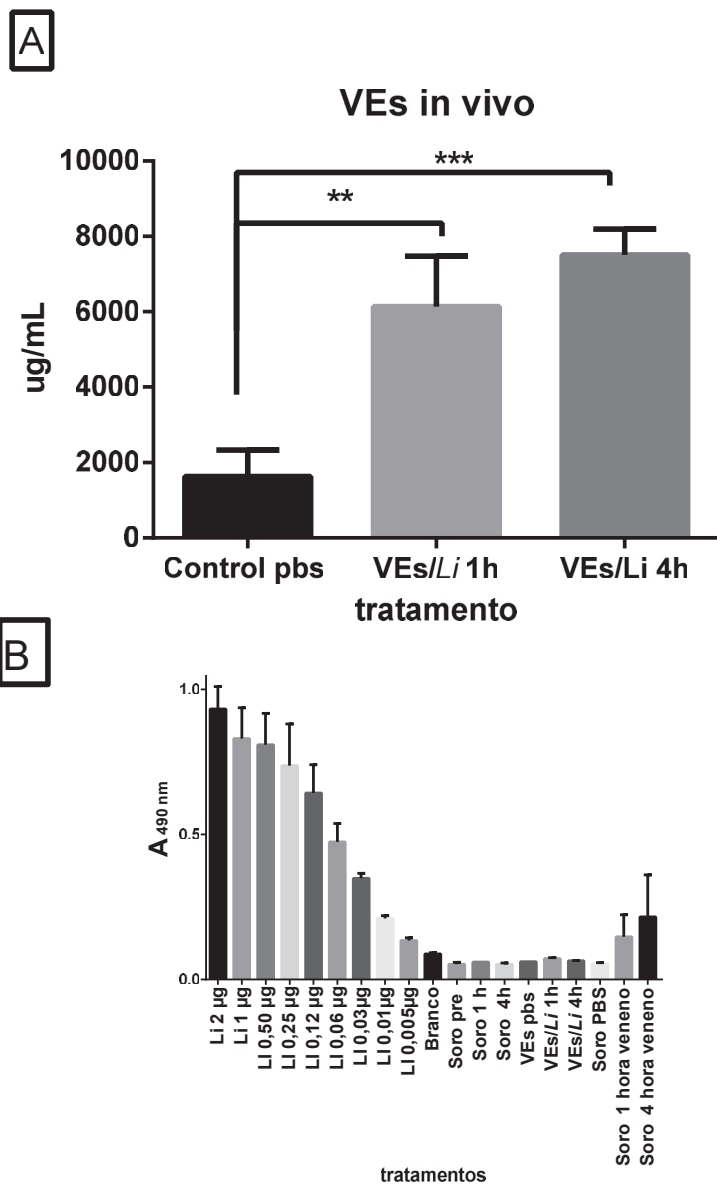


FONTE: O autor (2018)

NOTA: **13A)** Eritrócitos 1×10^8 ml tratadas com concentrações do veneno de *Li* 10, 5, 2.5 μ g/ml, na presença de 10 μ g/ml *L. int* + 10 μ g/ml de mab7, controle positivo (Triton X-100) como 100% de hemólise (C+). Lactato ringer foi usado como controle negativo (C-). A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm. **13B)** Concentração de proteínas das VEs nas diferentes condições expostas na figura A. Os valores correspondem a média \pm SEM de dois experimentos independentes. *o valor-p <0,05.

5.8 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA PRODUÇÃO DE VES EM CAMUNDONGOS DESAFIADOS COM VENENO

Para confirmar a produção de vesículas extracelulares num modelo *in vivo*, um experimento foi realizado com camundongos, desafiados com veneno, durante 1 e 4 horas. Foram produzidas VEs de maneira tempo dependente, e também foi visto que a interação com veneno produz uma maior quantificação de proteínas em comparação com as VEs obtidas do controle com PBS. No entanto, o ensaio para determinar se as VEs possuíam veneno não foi sensível às amostras, sugerindo que outro tipo de metodologia para quantificar tais componentes, seja necessário.

FIGURA 14: LIBERAÇÃO DE VEs *IN VIVO*:

FONTE: O autor (2017)

NOTA: n= 6 Camundongos foram tratados com veneno *Li* (1 µg/g peso) e PBS em diferentes tempos 1 e 4 h; 2 camundongos foram tratados por 1 hora com veneno, 2 camundongos foram tratados por 4 horas com veneno, e grupo 2 camundongos foi tratado com PBS. após foi coletado soro total avaliando liberação de Vesículas extracelulares. 14B) representação gráfica do ELISA sanduiche com anticorpo Limab7 avaliando a presença de veneno dentro das VEs e sobrenadantes.

7. DISCUSSÃO

Venenos loxoscelicos possuem vários componentes com efeitos citotóxicos.

Nos últimos anos, o conhecimento sobre os venenos loxoscelicos cresceu muito, sendo que os estudos têm caracterizado o papel de alguns componentes do veneno, assim como os efeitos sobre as células (Tambourgi et al., 1998, 2000, 2005, 2007; Chaves-Moreira et al. 2009, 2011; Gresmki et al 2014). Além disso, diferentes autores conseguiram classificar as alterações citotóxicas induzidas pelas toxinas (Tambourgi 2005) e demonstraram o efeito dermonecrótico das mesmas em modelo animal (Barbaro et al 1992). Da mesma forma (Días Lopes 2010) foram mostrados os efeitos dos componentes do veneno de *Loxosceles intermedia* em cardiomiócitos de camundongos. Por outro lado, o trabalho de Nowatzki et al 2010 descreveu a ação do veneno de *L. intermedia* em células endoteliais. A descrição desses eventos e seus efeitos foram caracterizados demonstrando que as células endoteliais têm uma internalização do veneno, no entanto, esta internalização não é responsável diretamente pelos efeitos citotóxicos, o que sugere o envolvimento de outros eventos resultantes da interação entre célula e veneno.

Liberação de vesículas extracelulares pela interação do veneno e Li com células

Primeiramente foi mostrada a liberação de VEs durante a interação do veneno de *L. i* em contato Eritrócitos e com diferentes linhagens celulares THP1, HUVEC, HEK 293, Vero, e esta liberação é menor quando comparada com a produção de VEs estimuladas pelo CaCl_2 (Figura 1 e Tabela 1) corroborando com resultados de outras pesquisas realizadas em outros modelos, como o de infecção por HIV (Konuda et al 2016), e também em modelos de doenças como câncer (Al-Nedawi 2008), e parasitas (Ramirez et al., 2016; Evans-Osses et al., 2017). (Konuda et al 2016) mostraram a existência de vesículas extracelulares na infecção de HIV no plasma de pacientes soropositivos, além de caracterizar um perfil pro inflamatório por parte destas VEs. (Al-Nedawi et al 2008) demonstraram com o modelo celular de astrocitoma produz microvesículas, um dos tipos de VEs, e as

mesmas estão envolvidas em processos de comunicação celular. Além disso, (Ramirez et al 2016) demonstraram o protozoário *T cruzi*, em todos os estágios, tem a capacidade de induzir vesículas extracelulares.

Nos experimentos realizados nesse trabalho foi possível demonstrar que existe uma liberação contínua de vesículas extracelulares na presença de veneno, nas diferentes linhagens utilizadas (Figura 1B e 2). Foi confirmado por pesquisas realizadas em outros modelos de liberação de vesículas (Cestari et al 2012, Wyllie 2017) uma produção tempo dependente, e de acordo com o estímulo indutor. Outros autores (Skog et al 2008, Al-Nedawi 2009) demonstraram que células cancerígenas tem uma liberação contínua de VEs, que favorece o crescimento tumoral. (Hoshino et al 2015), mostram que a liberação contínua de exosomas por parte de células cancerígenas contribui na migração de precursores que favorecem a metástase.

Vesículas extracelulares na interação de células com veneno de Loxosceles intermedia carregam componentes de veneno com atividade biológica.

Os componentes das vesículas extracelulares são normalmente proteínas citosolicas e de membrana, ARN, lipídios entre outros (Raposo et al 2013, Gyorgi et al 2011, Cocucci et al 2011). Nesse trabalho VEs, resultantes da interação de eritrócitos com veneno foram avaliadas para confirmar a presença de componentes do veneno. Para isso, foram utilizados anticorpos policlonais de cavalo *anti-Li*, desenvolvido no Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos CPPI o que confirmaria a presença de componentes totais do veneno, além disso, foi utilizado o anticorpo monoclonal *anti-Li* mab7 (Alvarenga et al., 2003) específico para o componente fosfolipase D, descrito como dermonecrotico e hemolítico (Gremski et a., 2014, Tamborgui 2005 et al).

Na Figura 4, através da técnica de Elisa, foi possível detectar e quantificar componentes do veneno nas VEs, sendo de 1 a 3 %. Além disso, como mostrado na Figura 5, também foi realizada a técnica de *western blotting* que apresentou resultados semelhantes. Pode-se observar que a VEs-*Li* possuem componentes do veneno, e que em sua maioria corresponde a fosfolipase D, proteína descrita como dermonecrótica e caracterizada por diferentes autores (Lee et al 2005, Barbaro et

al 2005, Guilherme et al 2001, Tamborgui1995, Furtrell 1992). Também foi demonstrado que VEs-LR não possuem nenhum componente de *Li*.

A presença de componentes do veneno nas VEs permitiu também avaliar os efeitos biológicos das mesmas. Foi demonstrada atividade hemolítica esfingomielinasica (Figura 6), como também o efeito modulador da permeabilidade de membranas (Figura 10 e 11) produzidas pelas VEs obtidas durante a interação de eritrócitos com veneno de *Li*, confirmando o caráter de ineditismo desse trabalho. Na maioria dos ensaios biológicos em que foram demonstrados os efeitos do veneno presentes nas VEs foi também confirmado o potencial protetor do anticorpo monoclonal Limab7 (Figura 12 e 13). Esse resultado valida o emprego desse anticorpo na neutralização dos efeitos tóxicos do veneno e nos encoraja a empregá-lo na concepção de novos formatos de anticorpos mais adaptados para o diagnóstico e tratamento do loxoscelismo (Alvarenga et al., 2003, Jiacomini et al, 2016 e Karim-Silva et al, 2016).

Já é bem conhecido o caráter inflamatório induzido pelos venenos loxoscelicos, envolvendo aumento na produção de citocinas (Barbaro et al, 2010, Horta et al., 2013, Oliveira C et al., 2013, Rojas et al 2017.). No entanto, ainda não havia sido mostrado que VEs contendo toxinas, e produzidas a partir da interação de eritrócitos com veneno, seriam capazes de também induzir o aumento desses mediadores inflamatórios e que poderiam estar potencializando o efeito do veneno. Na Figura 7 é mostrado o aumento na produção de IL6 e TNF em células tratadas com VEs, as quais continham toxinas presentes no veneno de *Li*.

Eventos importantes como modelamento e reparo da membrana, tem sido caracterizado extensivamente em várias linhagens celulares resultantes da alteração da biologia celular, provocado por injurias (Atanassoff et al, 2014. Leoni et al, 2015. Romero et al, 2017). Também vários trabalhos já mostraram o envolvimento de *lipid rafts* na liberação de vesículas extracelulares (Pfriege F, e Vitale N, 2018. Record M et al 2018). Os resultados preliminares sugerem que o veneno de *Li* carregado nas VEs altera a integridade de membrana, possivelmente pela ação de esfingomielinases, permitindo a incorporação do veneno pelas células tratadas, e que essa entrada não é inibida pelo mecanismo de reparo (Figuras

11,12). Também foi demonstrado que a liberação de VEs pela ação do veneno dependendo desses achados precisam ser melhor estudados na presença de inibidores específicos, avaliação da cinética de injúria e reparo de membrana e na presença de VEs de diferentes origens.

Até agora, os dados mostrados confirmam a participação das VEs, produzidas pelo veneno em contato com os eritrócitos, em importantes eventos bem caracterizados no contexto do Loxoscelismo (hemólise, atividade esfingomielinase, etc) e abre novas perspectivas de estudos para o melhor entendimento do mecanismo de ação das toxinas e propagação do envenenamento.

REFERÊNCIAS

AHMAD, Z. A.; YEAP, S. K.; ALI, A. M.; HO, W. Y.; ALITHEEN, N. B. M.; HAMID, M. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–15, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jir/2012/980250/>>.

AL-NEDAWI, K.; MEEHAN, B.; KERBEL, R. S.; ALLISON, A. C.; RAK, J. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 10, p. 3794–3799, 10 mar. 2009. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804543106>>.

AL-NEDAWI, K.; MEEHAN, B.; MICALLEF, J.; LHOTAK, V.; MAY, L.; GUHA, A.; RAK, J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 619–624, 2008.

ALVARENGA, L. M.; MARTINS, M. S.; MOURA, J. F.; KALAPOTHAKIS, E.; OLIVEIRA, J. C.; MANGILI, O. C.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. **Toxicon**, v. 42, n. 7, p. 725–731, 2003.

AMARO, I.; RIAÑO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Isolation and characterization of a human antibody fragment specific for Ts1 toxin from *Tityus serrulatus* scorpion. **Immunology Letters**, v. 139, n. 1–2, p. 73–79, 2011.

APPEL, M. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; PALUDO, K. S.; SILVA, D. T.; CHAVES, D. M.; DA SILVA, P. H.; MANGILI, O. C.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1780, n. 2, p. 167–178, 2008.

ATANASSOFF, A. P.; WOLFMEIER, H.; SCHOENAUER, R.; HOSTETTLER, A.; RING, A.; DRAEGER, A.; BABIYCHUK, E. B. Microvesicle shedding and lysosomal repair fulfill divergent cellular needs during the repair of streptolysin O-induced plasmalemmal damage. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

BARBARO, K. C.; CARDOSO, J. L. C.; EICKSTEDT, V. R. D.; MOTA, I. Dermonecrotic and

lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, v. 30, n. 3, p. 331–338, 1992.

BARBARO, K. C.; KNYSACK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 489–499, 2005.

BARBARO, K. C.; LIRA, M. S.; ARAÚJO, C. A.; PAREJA-SANTOS, A.; TÁVORA, B. C. L. F.; PREZOTTO-NETO, J. P.; KIMURA, L. F.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; SANTORO, M. L. Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 972–979, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.06.022>>.

BRAZ, A.; MINOZZO, J.; ABREU, J. C.; GUBERT, I. C.; CARLOS CHÁVEZ-OLÓRTEGUI. Development and evaluation of the neutralizing capacity of horse antivenom against the Brazilian spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v. 37, n. 9, p. 1323–1328, 1999.

CATALÁN, A.; ESPOZ, M. C.; CORTÉS, W.; SAGUA, H.; GONZÁLEZ, J.; ARAYA, J. E. Tetracycline and penicillin resistant *Clostridium perfringens* isolated from the fangs and venom glands of *Loxosceles laeta*: Its implications in loxoscelism treatment. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 890–896, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.06.012>>.

CESTARI, I.; ANSA-ADDO, E.; DEOLINDO, P.; INAL, J. M.; RAMIREZ, M. I. Trypanosoma cruzi Immune Evasion Mediated by Host Cell-Derived Microvesicles. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 4, p. 1942–1952, 2012. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1102053>>.

CHAVES-MOREIRA, D.; CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. S.; GREMSKI, L. H.; DONATTI, L.; DE MOURA, J.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DA SILVEIRA, R. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 107, n. 4, p. 655–666, 2009.

CHOW, S. K.; CASADEVALL, A. Monoclonal antibodies and toxins--a perspective on function and isotype. **Toxins**, v. 4, n. 6, p. 430–454, 2012.

COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends in Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 43–51, 2009.

CRIST, W. M.; GARNSEY, L.; BELTANGADY, M. S.; GEHAN, E.; RUYMANN, F.; WEBBER, B.; HAYS, D. M.; WHARAM, M.; MAURER, H. M. Prognosis in children with rhabdomyosarcoma: A report of the intergroup rhabdomyosarcoma studies I and II. **Journal of Clinical Oncology**, v. 8, n. 3, p. 443–452, 1990.

DA SILVA, P. H.; DA SILVEIRA, R. B.; HELENA APPEL, M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693–709, 2004.

DIAS-LOPES, C.; FELICORI, L.; GUIMARÃES, G.; GOMES, E. R. M.; ROMAN-CAMPOS, D.; DUARTE, H.; DAMASCENO, D.; MARTINS, M.; KALAPOTHAKIS, E.; ALMEIDA, A. P.; GRANIER, C.; CRUZ, J. S.; GUATIMOSIM, S.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Cardiotoxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom and the recombinant venom toxin rLiD1. **Toxicon**, v. 56, n. 8, p. 1426–1435, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.08.008>>.

DIAS-LOPES, C.; FELICORI, L.; RUBRECHT, L.; COBO, S.; MOLINA, L.; NGUYEN, C.; GALÉA, P.; GRANIER, C.; MOLINA, F.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Generation and molecular characterization of a monoclonal antibody reactive with conserved epitope in sphingomyelinases D from *Loxosceles* spider venoms. **Vaccine**, v. 32, n. 18, p. 2086–2092, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.012>>.

DIAS-LOPES, C.; NESHICH, I. A. P.; NESHICH, G.; ORTEGA, J. M.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; MOLINA, F.; FELICORI, L. Identification of new sphingomyelinases D in pathogenic fungi and other pathogenic organisms. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–12, 2013.

DRAGULEV, B.; BAO, Y.; RAMOS-CERRILLO, B.; VAZQUEZ, H.; OLVERA, A.; STOCK, R.; ALGARON, A.; FOX, J. W. Upregulation of IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2 dominates gene expression in human fibroblast cells exposed to *Loxosceles reclusa* sphingomyelinase D: Insights into spider venom dermonecrosis [2]. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 5, p. 1264–1266, 2007.

ESPINO-SOLIS, G. P.; RIAÑO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 183–199, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.020>>.

EVANS-OSSES, I.; MOJOLI, A.; MONGUIÓ-TORTAJADA, M.; MARCILLA, A.; ARAN, V.; AMORIM, M.; INAL, J.; BORRÀS, F. E.; RAMIREZ, M. I. Microvesicles released from *Giardia*

intestinalis disturb host-pathogen response in vitro. **European Journal of Cell Biology**, v. 96, n. 2, p. 131–142, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.01.005>>.

EVANS-OSSES, I.; REICHEMBACH, L. H.; RAMIREZ, M. I. Exosomes or microvesicles? Two kinds of extracellular vesicles with different routes to modify protozoan-host cell interaction. **Parasitology Research**, v. 114, n. 10, p. 3567–3575, 2015.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; ELIAS, M. C. Q. B.; GRANER, E.; MANGILI, O. C.; BRENTANI, R. R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 1039–1051, 1998.

FELICORI, L.; FERNANDES, P. B.; GIUSTA, M. S.; DUARTE, C. G.; KALAPOTHAKIS, E.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. **Vaccine**, v. 27, n. 31, p. 4201–4208, 2009.

FUKUDA, D. A.; CAPORRINO, M. C.; BARBARO, K. C.; DELLA-CASA, M. S.; FAQUIM-MAURO, E. L.; MAGALHAES, G. S. Recombinant phospholipase D from *Loxosceles gaucha* binds to platelets and promotes phosphatidylserine exposure. **Toxins**, v. 9, n. 6, 2017.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 304, n. 4, p. 261–267, 1992. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002962915356214>>.

GREMSKI, L. H.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V. P.; MATSUBARA, F. H.; MEISSNER, G. O.; WILLE, A. C. M.; VUITIKA, L.; DIAS-LOPES, C.; ULLAH, A.; DE MORAES, F. R.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; BARBARO, K. C.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**, v. 83, p. 91–120, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.023>>.

GYÖRGY, B.; SZABÓ, T. G.; PÁSZTÓI, M.; PÁL, Z.; MISJÁK, P.; ARADI, B.; LÁSZLÓ, V.; PÁLLINGER, É.; PAP, E.; KITTEL, Á.; NAGY, G.; FALUS, A.; BUZÁS, E. I. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 16, p. 2667–2688, 2011.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: Old obstacles, new directions.

Annals of Emergency Medicine, v. 44, n. 6, p. 608–624, 2004.

HORTA, C. C. R.; OLIVEIRA-MENDES, B. B. R.; DO CARMO, A. O.; SIQUEIRA, F. F.; BARROCA, T. M.; DOS SANTOS NASSIF LACERDA, S. M.; DE ALMEIDA CAMPOS, P. H.; DE FRANÇA, L. R.; FERREIRA, R. L.; KALAPOTHAKIS, E. Lysophosphatidic acid mediates the release of cytokines and chemokines by human fibroblasts treated with loxosceles spider venom. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 6, p. 1682–1685, 2013.

ISBISTER, G. K.; FAN, H. W. Spider bite. **The Lancet**, v. 378, n. 9808, p. 2039–2047, 2011.

JIACOMINI, I.; SILVA, S. K.; AUBREY, N.; MUZARD, J.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; DE MOURA, J.; BILLIALD, P.; ALVARENGA, L. M. Immunodetection of the “brown” spider (*Loxosceles intermedia*) dermonecrototoxin with an scFv-alkaline phosphatase fusion protein. **Immunology Letters**, v. 173, p. 1–6, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2016.03.001>>.

KARIM-SILVA, S.; DE MOURA, J.; NOIRAY, M.; MINOZZO, J. C.; AUBREY, N.; ALVARENGA, L. M.; BILLIALD, P. Generation of recombinant antibody fragments with toxin-neutralizing potential in loxoscelism. **Immunology Letters**, v. 176, p. 90–96, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2016.05.019>>.

LEONI, G.; NEUMANN, P.; KAMALY, N.; QUIROS, M.; NISHIO, H.; JONES, H. R.; SUMAGIN, R.; HILGARTH, R. S.; ALAM, A.; FREDMAN, G.; ARGYRIS, I.; RIJCKEN, E.; KUSTERS, D.; REUTELINGSPERGER, C.; PERRETTI, M.; PARKOS, C. a; FAROKHZAD, O. C.; NEISH, A. S.; NUSRAT, A. Annexin A1 – containing extracellular vesicles and polymeric nanoparticles promote epithelial wound repair. **J Clin Invest**, v. 125, n. 10, p. 1215–1227, 2015. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/76693/version/2/pdf/render>>.

LOVRECEK, D.; TOMIĆ, S. A century of antivenom. **Collegium antropologicum**, v. 35, n. 1, p. 249–258, 2011.

MÁLAQUE, C. M. S. A.; CASTRO-VALENCIA, J. E.; CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. de S.; BARBARO, K. C.; FAN, H. W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 44, n. 3, p. 139–143, 2002.

MANZONI-DE-ALMEIDA, D.; SQUAIELLA-BAPTISTÃO, C. C.; LOPES, P. H.; VAN DEN

BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. Loxosceles venom Sphingomyelinase D activates human blood leukocytes: Role of the complement system. **Molecular Immunology**, v. 94, n. December 2017, p. 45–53, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.12.009>>.

MARTÍNEZ, A.; ACUÑA, S.; DÍAZ, S.; CAMILO, J.; GUERRERO, V.; ALEJANDRO, L. Accidente por araña Loxosceles spp.: reporte de caso y revisión de literatura. **Universitas Médica**, v. 55, n. 3, p. 340–348, 2014. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231033730010>>.

MORERA, D.; MACKENZIE, S. A. Is there a direct role for erythrocytes in the immune response? **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 89, 2011. Disponível em: <<http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/89>>.

NOWATZKI, J.; DE SENE, R. V.; PALUDO, K. S.; VEIGA, S. S.; OLIVER, C.; JAMUR, M. C.; NADER, H. B.; TRINDADE, E. S.; FRANCO, C. R. C. Brown spider venom toxins interact with cell surface and are endocytosed by rabbit endothelial cells. **Toxicon**, v. 56, n. 4, p. 535–543, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.027>>.

NOWATZKI, J.; SENE, R. V.; PALUDO, K. S.; RIZZO, L. E.; SOUZA-FONSECA-GUIMARÃES, F.; VEIGA, S. S.; NADER, H. B.; FRANCO, C. R. C.; TRINDADE, E. S. Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom triggers endothelial cells death by anoikis. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 396–405, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.333>>.

OKAMOTO, C. K.; VAN DEN BERG, C. W.; MASASHI, M.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; TAMBOURGI, D. V. Tetracycline reduces kidney damage induced by loxosceles spider venom. **Toxins**, v. 9, n. 3, p. 1–16, 2017.

OLIVEIRA-LIMA, C. D.; FARSKY, K.; LOPES, S. H.; HESS, ANDRADE, de P.; DE ANDRADE, R. M. G.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. Microcirculation abnormalities provoked by *Loxosceles* spiders' envenomation. **Toxicon**, v. 116, p. 35–42, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.08.005>>.

OLIVEIRA, C. Z. Caracterização funcional e estrutural de inibidores de fosfolipases A2 isolados do plasma de serpente *Bothrops jararacussu*. p. 124, 2009.

PALUDO, K. S.; GREMSKI, L. H.; VEIGA, S. S.; CHAIM, O. M.; GREMSKI, W.; BUCHI, D. de F.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; FRANCO, C. R. C. The effect of brown spider venom

on endothelial cell morphology and adhesive structures. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 844–853, 2006.

PATEL, K. D.; MODUR, V.; ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, S. M.; MCINTYRE, T. M. The Necrotic Venom of the Brown Recluse Spider Induces Dysregulated Endothelial Cell-dependent Neutrophil Activation Differential Induction of GM-CSF, IL-8, and E-Selectin Expression. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 2, p. 631–642, 1994.

PAULI, I.; MINOZZO, J. C.; HENRIQUE DA SILVA, P.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon**, v. 53, n. 6, p. 660–671, 2009.

PAULI, I.; PUKA, J.; GUBERT, I. C.; MINOZZO, J. C. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon**, v. 48, n. 2, p. 123–137, 2006.

PFRIEGER, F.; VITALE, N. Cholesterol and the journey of extracellular vesicles. **Journal of Lipid Research**, 2018.

RAMIREZ, M. I.; DEOLINDO, P.; DE MESSIAS-REASON, I. J.; ARIGI, E. A.; CHOI, H.; ALMEIDA, I. C.; EVANS-OSSES, I. Dynamic flux of microvesicles modulate parasite–host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in eukaryotic cells. **Cellular Microbiology**, v. 19, n. 4, 2017.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013.

RECORD, M.; SILVENTE-POIROT, S.; POIROT, M.; WAKELAM, M. J. O. Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions. **Journal of Lipid Research**, n. 8, p. jlr.E086173, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29764923>><http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.E086173>>.

RICHARDS, R. The role of erythrocytes in the inactivation of free radicals. **Australian Journal of Medical Science**, v. 17, n. 4, p. 163, 1996.

ROJAS, J. M.; ARÁN-SEKUL, T.; CORTÉS, E.; JALDÍN, R.; ORDENES, K.; ORREGO, P. R.; GONZÁLEZ, J.; ARAYA, J. E.; CATALÁN, A. Phospholipase d from *loxosceles laeta* spider venom induces IL-6, IL-8, CXCL1/GRO- α , and CCL2/MCP-1 production in human

skin fibroblasts and stimulates monocytes migration. **Toxins**, v. 9, n. 4, p. 1–20, 2017.

ROMERO, M.; KEYEL, M.; SHI, G.; BHATTACHARJEE, P.; ROTH, R.; HEUSER, J. E.; KEYEL, P. A. Intrinsic repair protects cells from pore-forming toxins by microvesicle shedding. **Cell Death and Differentiation**, v. 24, n. 5, p. 798–808, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.11>>.

SKOG, J.; WURDINGER, T.; RIJN, S. Van; MEIJER, D.; GAINCHE, L.; SENA-ESTEVEES, M.; JR, W. T. C.; CARTER, R. S.; KRICHEVSKY, A. M.; BREAKFIELD, X. O. NIH Public Access. **Nature cell biology**, v. 10, n. 12, p. 1470–1476, 2012.

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clinics in Dermatology**, v. 24, n. 3, p. 213–221, 2006.

TAMBOURGI, D. V.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; VAN DEN BERG, C. W. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1113–1119, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.021>>.

TAMBOURGI, D. V.; MAGNOLI, F. C.; VAN DEN BERG, C. W.; MORGAN, B. P.; DE ARAUJO, P. S.; ALVES, E. W.; DA SILVA, W. D. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 251, n. 1, p. 366–373, 1998.

TAMBOURGI, D. V.; PEDROSA, M. F. F.; DE ANDRADE, R. M. G.; BILLINGTON, S. J.; GRIFFITHS, M.; VAN DEN BERG, C. W. Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 4, p. 576–582, 2007.

THEAKSTON, R. D. G.; LALLOO, D. G. Venomous Bites and Stings. **Principles and Practice of Travel Medicine: Second Edition**, v. 26, n. 2, p. 415–433, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.006>>.

VEGA-ROBLEDO, G. Loxoscelismo cutâneo necrótico. Informe de un caso. v. 58, n. 3, p. 171–176, 2011.

VEIGA, S. S.; FEITOSA, L.; DOS SANTOS, V. L. P.; DE SOUZA, G. A.; RIBEIRO, A. S.; MANGILI, O. C.; PORCIONATTO, M. A.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; BRENTANI, R. R.; GREMSKI, W. Effect of brown spider venom on basement membrane structures.

Histochemical Journal, v. 32, n. 7, p. 397–408, 2000.

VETTER, R. S.; ISBISTER, G. K. Medical Aspects of Spider Bites. **Annual Review of Entomology**, v. 53, n. 1, p. 409–429, 2008. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ento.53.103106.093503>>.

WHO. Bites and stings due to terrestrial and Morsures et piquûres d ' animaux terrestres et aquatiques en Europe. **WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD**, n. 38, p. 291:297, 2001. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/231636/WER7638_290-298.PDF?sequence=1>.

WILLE, A. C. M.; CHAVES-MOREIRA, D.; TREVISAN-SILVA, D.; MAGNONI, M. G.; BOIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; CHAIM, O. M.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Modulation of membrane phospholipids, the cytosolic calcium influx and cell proliferation following treatment of B16-F10 cells with recombinant phospholipase-D from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 67, p. 17–30, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.027>>.

WYLLIE, M. P.; RAMIREZ, M. I. Microvesicles released during the interaction between *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII strains and host blood cells inhibit complement system and increase the infectivity of metacyclic forms of host cells in a strain-independent process. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 7, 2017.